

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Programa de Pós-Graduação
em Química



Estudo fitoquímico e análise biológica/farmacológica
de *Bredemeyera flobibunda* Willd

Gizely de Vasconcelos Leite Cavalcante

Dissertação de Mestrado
Natal/RN, janeiro de 2015

Gizely de Vasconcelos Leite Cavalcante

ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE BIOLÓGICA/FARMACOLÓGICA
DE *Bredemeyera floribunda* Willd

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo

NATAL/RN

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede.
Catalogação da Publicação na Fonte.

Cavalcante, Gizely de Vasconcelos Leite.

Estudo fitoquímico e análise biológica/farmacológica de *Bredemeyera floribunda* Willd / Gizely de Vasconcelos Leite Cavalcante. – Natal, RN, 2015.

105 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química. Natal, RN, 2015

1. *Bredemeyera floribunda* - Dissertação. 2. Antibotrópico - Dissertação. 3. Raiz - Dissertação. 4. Isolamento - Dissertação. 5. Metabolitos secundários – Dissertação. I. Araújo, Renata Mendonça. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 615.89

Gizely de Vasconcelos Leite Cavalcante

ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE BIOLÓGICA/FARMACOLÓGICA DE
BREDEMEYERA FLORIBUNDA WILLD

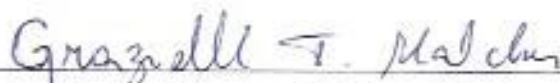
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte, em cumprimento às exigências para
obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 09 de janeiro de 2015

Comissão Examinadora:



Dra. Renata Mendonça Araújo – UFRN (orientadora)



Dra. Grazielle Tavares Malcher – UFRN



Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza – UFPB

Dedico este trabalho ao meu pai, que mesmo não estando mais aqui, é responsável por tudo o que sou e pelo meu caráter, que foi construído através do exemplo que sempre foi em minha vida. À minha mãe, por todo seu carinho e atenção. À minha irmã, pela companhia, amizade e carinho. E, ao meu namorado, que tão carinhosamente me acompanhou durante toda essa jornada, que compreendeu minha ausência e esteve sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, que me deu forças para prosseguir, mesmo com todas as turbulências e me permitiu chegar até aqui;

Agradeço ao meu pai, Raimundo, que mesmo não estando mais aqui, é o responsável por tudo o que sou, é a minha força, minha inspiração e minha motivação;

À minha mãe Giselda, que mesmo não entendendo bem aquilo que faço, me dá todo o suporte para continuar, compreendendo a minha ausência e respeitando as minhas escolhas. Obrigada por seu amor incondicional, mãe!

À minha irmã Rafaely, por todo seu amor, admiração, respeito e amizade. É por nossa família que vivo, te amo maninha!

Ao meu namorado Leandro, que caminhou ao meu lado sempre, por seu apoio, compreensão por minha ausência, paciência quando eu estive estressada, por me fazer feliz e por me fazer sentir tão amada. Obrigada por teu imenso amor, te amo demais, minha vida!

À todos da família, que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse prosseguir;
Aos meus sogros Beatriz e Marcelo, pela admiração e incentivo;

Às minhas amigas Sheila, Vanúcia e Samara que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava, que me incentivaram e que me deram força para conseguir;

Aos companheiros de laboratório: Anne, Deusielly, Sheeza e Taiane por me receberem tão bem e por terem me ensinado tanto. Agradeço especialmente a Nara, Vanessa, Marcela, Daniele, Lilian e a Rusceli, por emprestarem seus ouvidos às minhas lamentações, pelo ombro amigo, pela palavra de consolo e incentivo. Obrigada por não me deixarem fraquejar!

À Fátima, que dividiu comigo as angústias das disciplinas e todas as incertezas;

À professora Renata Mendonça, que me aceitou com todas as minhas limitações;

Ao professor Edgar Perin, por tão prontamente me atender todas as vezes que precisei. Obrigada por sua atenção!

À professora Tereza Neuma, que não hesitou em me ajudar sempre que precisei de seu auxílio;

Aos técnicos do laboratório da Engenharia Química: Thayrone, pela sua paciência em me ensinar a operar o equipamento; Batista, pela disposição em me ajudar quando eu precisava e pela companhia, à Paulino e a Cristiane, por desprenderem tempo para me acompanhar no final do expediente. Obrigada a todos vocês pelas conversas, sempre muito engraçadas, e por tornarem o ambiente tão agradável para mim, vocês faziam eu “me sentir em casa”;

Ao prof. Eduardo, que abriu as portas do seu laboratório para mim, mesmo sem me conhecer;

À professora Silvana, por poder utilizar os equipamentos de seu laboratório. E à Júlia, que por várias vezes saiu tarde do laboratório pra que eu pudesse concluir os meus procedimentos;

Ao professor Edilberto Silveira (CENAUREMN), por disponibilizar equipamentos e materiais, fundamentais a esse trabalho;

À todos, que de forma direta ou indiretamente, contribuíram para que eu estivesse aqui e pudesse concluir este trabalho;

À CNPq pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

Algumas espécies de plantas são utilizadas na medicina popular para tratar acidentes com animais peçonhentos. A espécie *Bredemeyera floribunda* Willd é uma destas. Ela pertence à família *Polygalaceae* e é conhecida popularmente como “raiz de cobra”. Além de suas propriedades antiofídicas, também é conhecida por suas propriedades expectorante, diurética e hipotensiva. Devido a sua importância etnofarmacológica, esta espécie ainda necessita de estudos acerca de seus constituintes químicos. Este trabalho relata o estudo fitoquímico realizado com as raízes desta espécie. Foram realizadas análises qualitativas através de técnicas cromatográficas: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia de Adsorção e Cromatografia de Exclusão Molecular. O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das raízes resultou no isolamento de sete substâncias, sendo a primeira um derivado do ácido cinâmico, denominado (2E)- metil 3-(3,4,5-trimetóxfenil)-prop-2-enoato, inédita para o gênero, o flavonóide Rutina e três xantonas, a primeira denominada 1,7-dihidróxi-3,4,8-trimetoxixantona, a segunda, 1,3,7-trihidroxi-4,8-dimetoxixantona, e uma terceira xantona dimetóxilada, possivelmente inédita na literatura. Foram isolados sacarose e um derivado de Manitol, bicíclico. Além disso, saponinas triterpênicas também foram identificadas. A determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados foi realizada através das técnicas: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , através de seqüências de pulsos uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com dados da literatura. Algumas substâncias isoladas, frações e o extrato etanólico foram submetidos a ensaio hemorrágico e proteolítico. Nestes ensaios, observou-se que o extrato mostrou-se ativo e que das substâncias testadas, as xantonas 1,3,7-trihidroxi-4,8-dimetoxixantona e 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona obtiveram resultados satisfatórios. Frações contendo xantonas e saponinas também foram submetidas aos testes e demonstraram resultados promissores.

Palavras-chave: *Bredemeyera floribunda*; *Polygalaceae*; “raiz-de-cobra”; antiofídico

ABSTRACT

Some plant species are used in folk medicine to treat accidents with poisonous animals. The species *Bredemeyera floribunda* Willd (Polygalaceae), popularly known as "snake root" has this popular use. In addition to its anti-snake venom properties, the species is also known for its expectorant, diuretic and hypotensive properties. Due to its ethnopharmacological importance, this species still needs chemical studies. This work reports the phytochemical study from roots of the *B. floribunda*. Were performed analysis using chromatographic techniques: High Performance Liquid Chromatography, Adsorption Chromatography and Molecular Exclusion Chromatography. Chromatographic fractionation from ethanolic extract of the roots of *B. floribunda* resulted in the isolation of seven substances, the first being a derivative of cinnamic acid, known as (2E)-methyl-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-prop-2-enoate, unpublished in the *Bredemeyera* genus, flavonoid rutin and three xanthones, the first called 1,7-dihydroxy-3,4,8-trimethoxy-xanthone, the second, 1,3,7-trihydroxy-4,8-dimethoxy-xanthone, and a third dimethoxyl-xanthone, possibly not previously report in the literature. Were isolated also the sucrose and a derivative bicyclic of mannitol. Furthermore, saponines have also been identified. The structural determination of secondary metabolites was performed by nuclear magnetic resonance ^1H and ^{13}C , using 1D and 2D pulse sequences and comparison with the literature data. Some isolated compounds, fractions, and the ethanol extract were subjected to hemorrhagic and proteolytic assays. In these tests, it was observed that the extract showed to be active and which of the tested substances, xanthones 1,3,7-trihydroxy-4,8-dimethoxy-xanthone and 1,7-dihydroxy-3,4,8-obtained results trimethoxy-xanthone satisfactory. Fractions containing xanthones and saponins also were submitted to the tests and showed promising results.

Keywords: *Bredemeyera floribunda*; *Polygalaceae*; "raiz-de-cobra"; antiophidic

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotos de <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	27
Figura 2 -	Distribuição geográfica da espécie <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	27
Figura 3 -	Estrutura básica da saponina característica da família Polygalacea	33
Figura 4 -	Bredemeyerosídeo D da espécie <i>B. Floribunda</i> com dados de RMN ¹³ C	33
Figura 5 -	Primeiro fragmento na biossíntese de saponinas triterpênicas que leva ao precursor 2,3-epóxido de esqualeno	35
Figura 6 -	Ciclização do 2,3-epóxido de esqualeno e a formação das saponinas	37
Figura 7 -	Estrutura básica da xantona	38
Figura 8 -	Esquema de biossíntese de xantonas	40
Figura 9 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 500MHz) de BFRE	61
Figura 10 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 300 MHz) de BFR-1	62
Figura 11 -	Espectro de expansão da área compreendida entre δ 6,21 e 7,67 de BFR-1	63
Figura 12 -	Espectro de RMN ¹³ C (C ₅ D ₅ N, 75 MHz) de BFR-1	64
Figura 13 -	Estrutura do flavonóide Rutina (BFR-1)	64
Figura 14 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de BFR-2	66
Figura 15 -	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de BFR-2	67
Figura 16 -	Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° (CDCl ₃ , 125 MHz) de BFR-2	68
Figura 17 -	Espectro bidimensional (¹ J _{H,C}) – HSQC (CDCl ₃) de BFR-2	69
Figura 18 -	Espectro de RMN bidimensional– HMBC (CDCl ₃) de BFR-2	70
Figura 19-	Estrutura do (2E)-3'-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-enoato de metila (BFR-2)	71
Figura 20 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de BFR-3	72
Figura 21 -	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de BFR-3	73
Figura 22 -	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (¹ J _{H,C}) – HSQC (CDCl ₃) de BFR-3	74
Figura 23 -	Estrutura química do 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona	74
Figura 24	Cromatograma da fração BFRE-2 CHCl ₃ -4 obtido por CLAE (370nm) com eluição isocrática de CNCH ₃ /H ₂ O (45:55)	76
Figura 25 -	Espectro de RMN ¹ H (MeOD, 500 MHz) de BFR-4	77
Figura 26 -	Espectro de RMN ¹³ C (MeOD, 125 MHz) de BFR-4	77

Figura 27 -	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1J_{H,C}$) – HMQC (MeOD) de BFR-4	78
Figura 28 -	Espectro de RMN bidimensional - HMBC (MeOD) de BFR-4	79
Figura 29 -	Estrutura química do 1,3,7-trihidróxi-4,8-dimetóxi-xantona	81
Figura 30 -	Cromatograma da fração BFRE-2 CHCl ₃ -1 obtido por CLAE (370nm) com eluição isocrática de CNCH ₃ /H ₂ O (50:50)	82
Figura 31 -	Espectro de RMN 1H (DMSO, 500 MHz) de BFR-5	83
Figura 32 -	Espectro de RMN ^{13}C (DMSO, 125 MHz) de BFR-5	83
Figura 33 -	Espectro de RMN bidimensional HMBC (DMSO) de BFR-5	84
Figura 34 -	Proposta de estrutura para BFR-5	84
Figura 35 -	Espectro de RMN 1H (MeOD, 500 MHz) de P2	85
Figura 36 -	Espectro de RMN ^{13}C e expansões (MeOD, 125 MHz) de P2	86
Figura 37 -	Espectro de RMN 1H (D ₂ O, 500 MHz) de BFR-6	88
Figura 38 -	Expansão da região entre δ 3,2 e 4,0 do espectro de 1H de BFR-6	88
Figura 39 -	Espectro RMN ^{13}C e DEPT 135° (D ₂ O, 75 MHz) de BFR-6	89
Figura 40 -	Espectro de RMN correlação heteronuclear-HMQC (D ₂ O) de BFR-6	90
Figura 41 -	Espectro de correlação homonuclear – COSY (D ₂ O) de BFR-6	90
Figura 42 -	Estrutura do Manitol	91
Figura 43 -	Estrutura química do composto BFR-6	91
Figura 44 -	Espectro de RMN ^{13}C (DMSO, 125 MHz) da fração BFRE-2A8	92
Figura 45 -	Cromatograma da fração BFRE-2A8 obtido por CLAE (200nm) com eluição isocrática de MeOH/H ₂ O(15:85)	93
Figura 46 -	Espectro de RMN 1H (C ₅ D ₅ N, 500 MHz) de BFR-7	93
Figura 47 -	Espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° (C ₅ D ₅ N, 125 MHz) de BFR-7	94
Figura 48 -	Estrutura da sacarose (BFR-7)	94
Figura 49 -	Espectro de RMN ^{13}C (D ₂ O, 125 MHz) da fração BFRE-2A2	96
Figura 50 -	Cromatograma da fração BFRE-2A2 obtido por CLAE (205nm) com eluição isocrática de CH ₃ CN/H ₂ O(50:50)	96
Figura 51 -	Inibição da peçonha de <i>B. jararacussu</i> por BFRE	97
Figura 52 -	Atividade antiproteolítica da fração BFRE-2A e frações obtidas de seu fracionamento cromatográfico	98
Figura 53 -	Atividade Antiproteolítica de P1, P2 e P3 obtidas a partir do fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl ₃ -4	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Compostos isolados de algumas espécies de plantas antiofídicas*	22
Tabela 2 -	Dados da obtenção dos extratos de <i>B. floribunda</i>	46
Tabela 3 -	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE	47
Tabela 4 -	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-1	48
Tabela 5 -	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2	49
Tabela 6 -	Dados referentes à eluição utilizado no fracionamento cromatográfico de BFRE-1D	50
Tabela 7 -	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-1D	50
Tabela 8 -	Dados referentes à eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-1E	51
Tabela 9 -	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-1E	51
Tabela 10 -	Dados referentes à eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-2A	53
Tabela 11 -	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2A	53
Tabela 12 -	Dados referentes à eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-2A9	55
Tabela 13	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2A9	55
Tabela 14	Dados referentes à partição de BFRE-2	56
Tabela 15	Dados referentes à eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl ₃	56
Tabela 16	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl ₃	57
Tabela 17	Dados de RMN ¹ H (MeOD, 300MHz) e ¹³ C (C ₅ D ₅ N, 75MHz) de BFR-1 e comparação com dados da literatura de MOURA et al., 2011	65
Tabela 18 -	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz) de BFR-2 dispostos segundo correlações obtidas através de HSQC e comparação com dados de RMN ¹³ C da literatura de RAO et al., 2012.	71
Tabela 19 -	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500MHz) e ¹³ C (CDCl ₃ , 125MHz) da substância BFR-3 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC em comparação com os dados da literatura.	75

Tabela 20 -	Dados de RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) e ^{13}C (MeOD, 125MHz) da substância BFR-4 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC em comparação com os dados da literatura	80
Tabela 21 -	Correlações obtidas a partir do espectro bidimensional HMQC de BFR-6	91
Tabela 22 -	Dados de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125MHz) da substância BFR-7 em comparação com os dados da literatura.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

NPPN -	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
FAPERJ -	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
IB -	Instituto Butantan
FUNED -	Fundação Ezequiel Dias
IVB -	Instituto Vital Brasil
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
IPP -	Isopentenil Pirofosfato
DMPP -	Dimetilalil Pirofosfato
TPP -	Tiamina Difosfato
FPP -	Fasenil Pirofosfato
GPP -	Geranil Pirofosfato
OSC -	Oxido Squalene Cyclase
CCD -	Cromatografia de Camada Delgada
CENAUREMN-	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética
UFC -	Nuclear da Universidade Federal do Ceará
DMSO -	Dimetilssulfóxido
DEPT -	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer),
BFRE -	Extrato etanólico da raiz de <i>Bredemeyera floribunda</i>
BFRE-1 -	Segundo extrato etanólico da raiz de <i>Bredemeyera floribunda</i>
BFRAQ -	Extrato aquoso da raiz de <i>Bredemeyera floribunda</i>
BFRMA -	Extrato da raiz de <i>Bredemeyera floribunda</i> em metanol/água (50:50
PEP -	Fosfoenol piruvato
DEPT -	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HSQC -	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC -	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
Hz	Hertz
ppm	Partes por milhão
CPD	Carbon Proton Decoupled

LAFAVET	Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas
VBju	Veneno de Bothrops jararacussu
PBS	Veneno de B. jararacussu em solução salina
SAB	Soro antibotrópico

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Substâncias isoladas da <i>Bredemeyera brevifolia</i>	26
Quadro 2 -	Substâncias isoladas da <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	29
Quadro 3-	Exemplos de representantes das classes das xantonas	39
Quadro 4-	Xantonas isoladas do gênero <i>Bredemeyera</i> com dados de RMN ¹³ C	41
Quadro 5 -	Correlações do espectro bidimensional – HMBC de BFR-2	70
Quadro 6 -	Correlações do espectro bidimensional – HMBC de BFR-4	80
Quadro 7 -	Xantonas presentes em P2	87

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	PLANTAS MEDICINAIS	19
1.1.1	Breve histórico da utilização de plantas medicinais	19
1.2	ACIDENTES OFÍDICOS	20
1.3	PLANTAS ANTIOFÍDICAS	21
2.	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	25
2.1	A FAMÍLIA POLYGALACEAE	25
2.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E QUÍMICAS DO GÊNERO <i>Bredemeyera</i>	25
2.3	<i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	26
2.3.1	Características morfológicas e localização geográfica	26
2.3.2	Uso popular e estudo biológico	27
2.3.3	Características químicas	28
3.	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	31
3.1	SAPONINAS	31
3.1.1	Aspectos gerais	31
3.1.2	Saponinas da família Polygalaceae	32
3.1.3	Rota Biosintética de saponinas triterpênicas	34
3.1.3.1	A partir de acetil-CoA até 2,3-oxidosqualeno	34
3.1.3.2	Ciclização do 2,3-epóxido de esqualeno	35
3.2	XANTONAS	38
3.2.1	Aspectos gerais	38
4.	OBJETIVOS	42
4.1	OBJETIVO GERAL	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1	MATERIAL VEGETAL	43
5.2	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	43
5.2.1	Cromatografia de Adsorção	43
5.2.2	Cromatografia de Exclusão Molecular	44
5.2.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	44

5.3	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	44
5.3.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)	44
5.4	MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISE	46
5.4.1	Determinação do ponto de fusão (Pf)	46
5.5	ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	46
5.5.1	Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das raízes de <i>B. floribunda</i> (BFRE, BFRE-1 e BFRE-2)	47
5.5.1.1	Fracionamento cromatográfico de BFRE-1D	49
5.5.1.2	Fracionamento cromatográfico de BFRE-1E	50
5.5.1.3	Fracionamento cromatográfico de BFRE-2A	52
5.5.1.3.1	Fracionamento cromatográfico de BFRE-2A8	54
5.5.1.3.2	Obtenção do espectro de RMN ¹³ C e o cromatograma da amostra BFRE-2A2	54
5.5.1.3.3	Fracionamento cromatográfico de BFRE-2A9	54
5.5.1.4	Partição do extrato BFRE-2	55
5.5.1.4.1	Fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl ₃	56
5.5.1.4.2	Fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl ₃ -1	57
5.5.1.4.3	Fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl ₃ -4	57
5.6	TESTES BIOLÓGICOS	58
5.6.1	Ensaio <i>in vivo</i>	59
5.6.1.1	Atividade Hemorrágica	59
5.6.2	Ensaio <i>in vitro</i>	60
5.6.2.1	Atividade Proteolítica	60
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1	ANÁLISE PRELIMINAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>B. floribunda</i> (BFRE)	61
6.2	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS DE <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	61
6.2.1	BFR-1	62
6.2.2	BFR-2	65
6.2.3	BFR-3	72
6.2.4	BFR-4	75
6.2.5	BFR-5	81

6.2.6	Discussão sobre o pico 2 encontrado nos cromatogramas de BFRE-2 CHCl ₃ -1 e BFRE-2 CHCl ₃ -4	85
6.2.7	BFR-6	87
6.2.8	BFR-7	91
6.3	IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS EM FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE <i>Bredemeyera floribunda</i> Willd	95
6.3.1	BFRE-2A2	95
6.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	97
6.4.1	Atividade Hemorrágica	97
6.4.2	Atividade Antiproteolítica	98
7.	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Considera-se planta medicinal, segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPS), aquela que ao longo dos tempos foi utilizada pela população para prevenir, curar doenças ou alterar processos fisiopáticos e é reconhecida por seu efeito benéfico para a saúde. Preparação farmacêutica ou medicina vegetal é aquela que é produzida exclusivamente de plantas (partes aéreas e não aéreas, resinas e óleos) em seu estado bruto ou com algum tipo de preparação (DA CUNHA et al., 2008).

As plantas medicinais foram durante muito tempo a base da medicina terapêutica. Segundo Ugaz, cerca de 25 % dos fármacos são de origem vegetal, enquanto 50 % são de origem sintética, embora relacionados com os metabólitos isolados de plantas medicinais (UGAZ, 1994).

Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 65-80 % da população de países emergentes, devido à pobreza e à falta de acesso a modernas instalações médicas, depende principalmente de plantas para os seus cuidados de saúde primários (CALIXTO, 2005). Além disso, os medicamentos fitoterápicos também estão ganhando popularidade entre a população ocidental, por possuírem menor ou nenhum efeito colateral quando administrados de forma correta (JORDAN et al., 2010).

O aumento expressivo no interesse por substâncias derivadas de espécies vegetais está comprovado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa em revistas científicas conceituadas nas áreas de Química e Farmacologia (CALIXTO, 2000).

1.1.1 Breve histórico da utilização de plantas medicinais

A utilização de plantas como medicamento é tão antiga quanto à própria existência do homem. Há relatos da utilização de plantas medicinais na terapêutica por várias civilizações antigas como chinesas, assírias e egípcias. Os egípcios, em seus papiros de 2.300 a.C. já mencionavam vários nomes de plantas como: mirra, ópio, aloe, cássia, entre outras, que eram utilizadas em atividades diárias como o embalsamento de múmias. (VOEKS, 2004). Para os gregos, as plantas medicinais eram tão importantes que havia uma casta, conhecida como “rhizotomoi” que eram considerados como procuradores de raízes (HILL, 1965).

Na medicina romana, ervas, raízes, ungüentos e emplastos eram utilizados frequentemente como recursos terapêuticos, e o laserpício (*laserpicium*) era especialmente usado como agente antiofídico no tratamento de picadas de cobras e escorpiões (ANDRÈ, 2006). O tratado escrito por Pedanius Dioscórides, na Grécia, no século I d.C. foi considerado a bíblia da etnobotânica durante 15 séculos por estar relatada 600 plantas medicinais da época.

O livro *Phytognomonica* de Giambattista della Porta, publicado em 1588, traz a *Teoria das Assinaturas* que é uma explicação das idéias de Paracelso, segundo a qual as plantas teriam sinais que orientariam sobre o poder curativo das mesmas. Para essa teoria, as plantas consideradas antiofídicas seriam aquelas que apresentassem desenho foliar que lembrasse o zig-zag da locomoção de cobras ou qualquer outra característica que fizesse lembrar serpentes (VILAR et al., 2005).

1.2 ACIDENTES OFÍDICOS

Segundo Mebs, animais peçonhentos são aqueles que possuem a capacidade de produzir e inocular substâncias tóxicas, como serpentes, abelhas, aranhas, escorpiões entre outros (MEBS, 2002). Acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública, principalmente em países tropicais, tanto pela quantidade de acidentes como também pela intensidade com que as peçonhas atuam no organismo humano. A maioria destes acidentes ocorre com vítimas nativas da zona rural e as picadas são geralmente nos membros inferiores e superiores estando relacionados com fatores climáticos e com o aumento da atividade Antrópica (KASTURIRATNE et al., 2008).

No Brasil, 90 % dos acidentes são causados por serpentes do gênero *Bothrops* com letalidade de 0,31%, seguido dos acidentes com serpentes do gênero *Crotalus* 7,7%, com letalidade de 1,87% (PINHO; PEREIRA, 2001).

A peçonha do gênero *Bothrops* possui atividade proteolítica, que determina o edema inflamatório no local picado, atividade coagulante, transformando diretamente o fibrinogênio em fibrina, e ainda possui a capacidade de ativar o fator X e a protrombina da cascata de coagulação sanguínea. Além disso, possui atividade hemorrágica, provocada pelas metaloproteases, que atuam no endotélio vascular da região picada e também à distância (COSTA, 2010).

Oficialmente, os acidentes ofídicos são tratados exclusivamente por soroterapia, que consiste na administração de anticorpos que auxiliam a neutralizar as toxinas da peçonha. Um dos fatores limitantes desse tratamento é que em alguns casos, as pessoas que são mordidas

residem em local afastado do lugar onde ocorre a administração do soro antiofídico. E consequentemente, a ação do soro se torna limitada, pois devido ao extenso tempo transcorrido até o atendimento, a peçonha já destruiu grande parte dos tecidos (CARDOSO et al., 2003). Um segundo fator negativo é o de que o soro antiofídico pode induzir manifestação de reações adversas, uma vez que os anticorpos eqüinos representam corpos estranhos ao organismo humano (ALAN; GOMEZ, 1998).

Os soros antibotrópicos atualmente utilizados no Brasil são produzidos pelo Instituto Butantan – IB (SP), Fundação Ezequiel Dias – FUNED (MG) e pelo Instituto Vital Brasil – IVB (RJ), através da imunização de cavalos com venenos provenientes das cinco espécies do gênero *Bothrops* mais dominante no Brasil: *B. jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* – 12,5% cada (Secretaria de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, 1996), e são distribuídos através da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) pelo Ministério da Saúde (LUCAS, 2009).

Mesmo a sorologia sendo a única prática médica oficial, outras práticas utilizadas em diversas partes do mundo para o tratamento de acidentes ofídicos são relatadas, como a utilização de plantas que são administradas sob a forma de infusão, decocção, maceração entre outras (OTERO et al., 2000a).

1.3 PLANTAS ANTIOFÍDICAS

Nas civilizações mesoamericanas e andinas pré-colombianas, os curandeiros utilizavam diversos ritos para tratar picadas de serpentes, dentre eles, bebidas e banhos preparados com decocção das raízes de inúmeras plantas (RUSSEL, 1983).

Os povos indígenas americanos continuaram a utilizar as plantas medicinais para tratar acidentes ofídicos durante todo o século XIX (OTERO et al., 2000b) e atualmente, alguns indígenas ainda utilizam este conhecimento para curar algumas doenças que atingem as suas comunidades (SOARES et al., 2005).

As plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos bioativos com capacidade de auxiliar diretamente no tratamento de envenenamentos ofídicos, ou indiretamente, complementando a utilização da soroterapia tradicional. Sendo assim, pessoas do mundo todo se utilizam de plantas para tratar acidentes ofídicos, principalmente indígenas e pessoas que residem em zona rural. A literatura reporta mais de 700 espécies de plantas que são utilizadas para este fim (MORS et al., 2000; SOARES et al., 2009).

Pesquisas realizadas com plantas utilizadas por curandeiros demonstraram resultados promissores em relação à atividade antiofídica (SOSA et al., 2002). Então, após a comprovação de que estas plantas inibem o efeito das toxinas da peçonha de serpentes, as mesmas se tornam alternativas econômicas para aquelas pessoas que estão mais expostas a sofrerem picadas de serpentes e que não têm acesso imediato à soroterapia (OTERO et al., 2000 a).

Nos últimos anos diversos estudos demonstraram que a flora brasileira possui vasta variedade de espécies de plantas medicinais com atividade antiofídica. Mors e colaboradores discutiram sobre 104 espécies com utilização popular em tratamentos de acidentes ofídicos, e sobre as classes de metabólitos relacionados com tal atividade (MORS et al., 2000). Algumas destas espécies, bem como os compostos isolados com tal atividade estão relacionadas na **Tabela 1**, a seguir:

Tabela 1: Compostos isolados de algumas espécies de plantas antiofídicas*

Família	Espécie	Compostos isolados
Betulaceae	<i>Betula Alba</i>	Betulina e ácido betulínico
Polygalaceae	<i>Bredemeyera floribunda</i>	Bredemeyerosídeos B, C e D
Leguminosae	<i>Brongniartia podalyrioides</i>	Eduinol
Boraginaceae	<i>Cordia verbenaceae</i>	Ácido rosmarínico (Cv-RA)
Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i>	Cinarina
Papilionaceae	<i>Derris serricea</i>	Derricidina
Papilionaceae	<i>Derris urucu</i>	2,5-dihidroximetil-3,4-dihidroxipirrolidina
Moraceae	<i>Dorstenia brasiliensis</i>	Bergapten
Boraginaceae	<i>Ehretia buxifolia</i>	Ehretianone
Combretaceae	<i>Guiera senegalensis</i>	Taninos
Fabaceae	<i>Harpalyce brasiliensis</i>	Eduinol
Apocynaceae	<i>Mandevilla velutina</i>	Esteróides
Fabaceae	<i>Mimosa pudica</i>	D-manitol, sitosterol
Piperaceae	<i>Piper caldense</i>	Caldensina
Asteraceae	<i>Silybum marianum</i>	Silimarina

* adaptação de SOARES et al., 2005 e DA SILVA et al., 2007

Fonte: próprio autor, 2015

No Norte e Nordeste do país, muitas pessoas utilizam uma formulação, não registrada pela ANVISA, denominada “Específico Pessoa”, desde o início do século XX (SILVA, 1997). O estudo fitoquímico realizado por Nakagawa e colaboradores em 1982 com esta formulação levou ao isolamento de dois pterocarpanos, as cabenegrinas A-I e A-II, que posteriormente tiveram sua ação antiofídica comprovada contra o veneno de *Bothrops atrox*. Duas espécies, então conhecidas popularmente como “raiz-de-cobra” no Nordeste, *Bredemeyera floribunda* e

Harpalyce brasiliensis foram estudadas e tiveram suas atividades antiofídicas comprovadas (PEREIRA et al., 1996; SILVA, 1997).

Posteriormente, notícia divulgada no site oficial da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) em 2005 anunciou a continuação dos estudos com a formulação “Específico Pessoa” pelo Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) a fim de ampliar os resultados das pesquisas já realizadas com esse produto (JÜRGENS, 2005).

B. brevifolia e *B. floribunda* são duas espécies de plantas do gênero *Bredemeyera* que já foram e continuam sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente, portanto, vários compostos já foram identificados e isolados dessas espécies.

As raízes, principalmente de *B. floribunda* são utilizadas amplamente aqui no Brasil, especialmente no Nordeste sob a forma de infusões, chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de diversas enfermidades, principalmente em acidentes ofídicos, cálculo renal e hipertensão, infecções da pele, disenteria amebiana, reumatismo e manifestações sífilicas (BEVEVINO; SANIOTO, 1994).

Os estudos fitoquímicos realizados com esta espécie constataram que seus principais constituintes são saponinas, xantonas e flavonóides. Dessas, as saponinas são a classe de substâncias mais interessantes presentes nesta espécie, visto que das substâncias isoladas, os Bredemeyerosídeos B, C e D apresentaram alta atividade antiofídica, o que fundamenta a possibilidade de que esta espécie seja um dos constituintes do preparo “Específico Pessoa”. Porém, estudos complementares são necessários para que se obtenha resultados conclusivos (SILVEIRA et al., 1995; PEREIRA et al., 1996; DAROS et al., 1996).

Das duas espécies pertencentes a este gênero, *B. floribunda* é mais frequentemente estudada quanto à sua ação antiofídica, visto que na medicina popular esta espécie é preferencialmente utilizada no tratamento de acidentes com serpentes. Além disso, alguns efeitos biológicos ou farmacológicos, como diuréticos, hipotensivos e proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol, ácido acetilsalicílico e histamina já foram comprovados e são relatados na literatura. E ainda, ensaios biológicos com o extrato bruto das raízes que demonstraram atividade antibotrópica contra os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, o que corrobora com o uso popular dessa espécie (SILVEIRA et al., 1995).

Tendo em vista a necessidade de informações fitoquímicas e biológicas mais profundas acerca de *B. floribunda*, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de realizar um novo estudo fitoquímico das raízes desta espécie, colaborando com a sua caracterização. A metodologia proposta compreende o isolamento, purificação e a determinação estrutural dos

metabólitos secundários isolados desta espécie através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

Deste modo, essa nova investigação fitoquímica das raízes de *B. floribunda* possibilitou o isolamento de um composto inédito para esse gênero, um derivado cinâmico, além de uma xantona já relatada na literatura para esta espécie, e dois carboidratos. Testes biológicos posteriores realizados com as substâncias isoladas poderão avaliar o potencial biológico.

Técnicas cromatográficas clássicas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram utilizadas para realização dos isolamentos preliminares e purificação das substâncias, e suas estruturas químicas foram elucidadas por método espectrométrico (Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais), método físico (ponto de fusão) e comparação com dados da literatura.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Bredemeyera floribunda* Willd

2.1 A FAMÍLIA POLYGALACEAE

A família Polygalaceae é uma família com grande diversidade de arbustos, árvores alpinistas, árvores de pequeno porte e algumas espécies saprófitas, isto é, que não realizam fotossíntese (S.H. FURNESS; P.I. STAFFORD, 1995). Esta família é classificada como cosmopolita, e está presente em quase todas as regiões do mundo, exceto na Nova Zelândia e nas regiões Árticas e Antártidas, sendo encontrada principalmente nas áreas tropicais e temperadas (MARQUES; PEIXOTO, 2007).

No Brasil, a família é representada por sete gêneros: *Barnhartia*, *Bredemeyera*, *Diclidanthera*, *Monnina*, *Moutabea*, *Polygala* e *Securidaca*, perfazendo um total de 240 espécies (LÜDTKE et al., 2008). A família Polygalaceae incita interesse ecológico, fitoquímico, taxonômico e florístico, pois suas espécies estão presentes em quase todas as regiões do país. Além disso, ela tem grande importância medicinal, sendo particularmente usada como expectorante para bronquites e asma, bem como sedativo e antipsicótico, antiinflamatório, antibacteriano, agente contra malária e contra tosse, reumatismo, contra picada de cobras e lepras (LACAILLE-DUBOIS; MITAINE-OFFER, 2005).

Contudo, ainda é economicamente pouco explorada (AGUIAR; FILHO 2008; SILVEIRA, 1995). Deste modo, o estudo fitoquímico desta família tem se mostrado promissor e estão relatados na literatura isolamentos de substâncias como cumarinas, saponinas, ácidos graxos, fenóis, alcalóides, flavonóides e xantonas, sendo que a maioria dessas xantonas apresentam um padrão pentaoxygenado. (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2000; SILVEIRA et al., 1995).

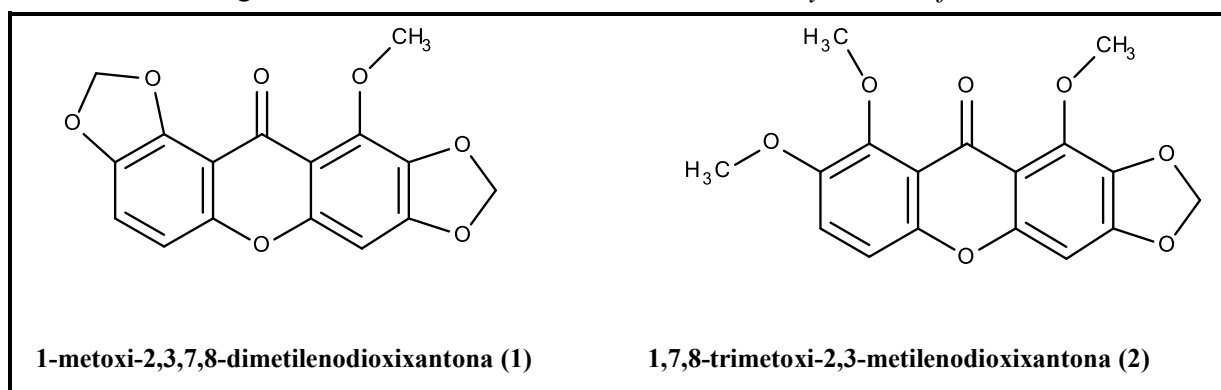
2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E QUÍMICAS DO GÊNERO *Bredemeyera*

O gênero *Bredemeyera* apresenta 15 espécies dispostas na América tropical, do Sul do México ao Paraguai, chegando a Argentina, segundo Persson (2001). No Ceará, estado situado no nordeste brasileiro, encontram-se duas espécies de *Bredemeyera*: *Bredemeyera floribunda* Willd., encontrada na serra de Ibiapaba, e *Bredemeyera brevifolia* Klotzsch., encontrada na chapada do Araripe (MATOS, 2007).

Espécies representantes deste gênero geralmente apresentam cálice pentâmero, corola trîmera com uma pétala abaxial (quilha ou carena), flores zigomorfas, ovário bicarpelar, unilocular ou bilocular por aborto (PERSSON, 2001).

Apesar de ser um gênero quimicamente pouco explorado, há relatos na literatura de estudo fitoquímico para duas espécies do gênero, a *B. floribunda*, cujo estudo será apresentado posteriormente e a *B. brevifolia*, da qual foi isolado duas xantonas (**Quadro 1**), além de diversos ácidos graxos como o ácido palmítico (C₁₆:0), oleico (C₁₈:1), estearico (C₂₀:0), behênico (C₂₂:0), lignocérico (C₂₄:0) e linoleico (C₁₈:2) de suas raízes (SILVEIRA, OLIVEIRA 2000).

Quadro 1 – Substâncias isoladas da *Bredemeyera brevifolia*



Fonte: próprio autor, 2015

Estão relatados testes biológicos na literatura em que a xantona (2) apresentou atividade antimicrobiana contra as espécies *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (SILVEIRA; OLIVEIRA, 2000).

2.3 *Bredemeyera floribunda* Willd

2.3.1 Características morfológicas e localização geográfica

A espécie *Bredemeyera floribunda* Willd (**Figura 1**) popularmente denominada “raiz de cobra”, “pacari” ou “botica inteira” pertence a família Polygalaceae e é representada por arbustos escandentes a lianas, 2-5 metros de altura; ramos densamente pubescentes; folhas elípticas; flores 6,5-7,5 mm comprimento, creme, amareladas; pétalas rudimentares ovadas, pétalas laterais elípticas; sementes estreito-elípticas, 10mm comprimento. Sobre a floração e a frutificação desta espécie, ocorre de janeiro a maio (LÜDTKE; MIOTTO, 2008).

B. floribunda pode ser encontrada na Venezuela, Peru, Paraguai e Brasil: de Roraima ao Paraná, ocorrendo em Caatinga, capões no cerrado e matas pluviais (LÜDTKE; MIOTTO,

2008). Mesmo estando presente por quase todo o país, não se observa a sua ocorrência no estado do Rio Grande do Norte (**Figura 2**).

Figura 1 – Fotos de *Bredemeyera floribunda* Willd



Fonte: Prof^o Francisco José de Abreu Matos, Horto de Plantas Medicinais, Campus do Pici, UFC.

Figura 2 – Distribuição geográfica da espécie *Bredemeyera floribunda* Willd



* As cores são apenas para realçar os estados onde os táxons ocorrem. Elas não têm nenhum significado além deste e foram escolhidas aleatoriamente.

Fonte: *Polygalaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro

2.3.2 Uso popular e estudo biológico

A utilização medicinal desta espécie pela população encontra respaldo nos estudos científicos, que comprovam a sua eficácia em vários modelos experimentais. Nessa conjuntura, alguns efeitos biológicos ou farmacológicos, como diuréticos, hipotensivos e oferecendo proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol, ácido acetilsalicílico e histamina são relatados na literatura, comprovando o uso dessa espécie na medicina popular (SILVEIRA et al., 1995).

As raízes secas são utilizadas pelos fitoterapeutas na sugestão de infusões como diuréticos em tratamentos de nefrolitíase (calculo renal), hipertensão arterial sanguínea, infecções da pele, disenteria amebiana, reumatismo e manifestações sífilicas (BEVEVINO; SANIOTO, 1994).

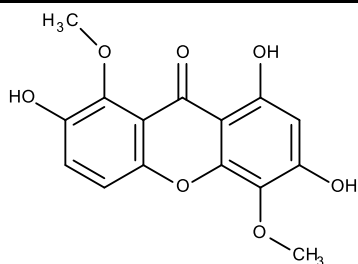
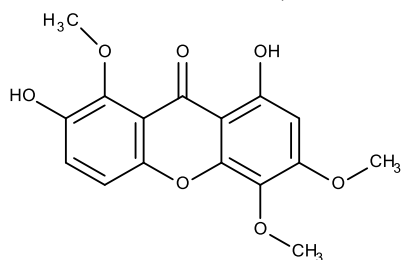
Além disso, no interior do estado do Ceará, as raízes desta espécie são comumente utilizadas na forma de solução alcoólica por sertanejos que desejam tratar picadas de cobras. Ensaio biológicos já foram efetuados com o extrato bruto destas raízes e já demonstraram atividade antibotrópica contra os venenos de *Bothrops* e *Crotalus* (SILVEIRA, 1995).

Estudo recentemente desenvolvido por Natacha Alves dispõe sobre vários testes realizados em ratos com o extrato aquoso das raízes de *B. floribunda*, entre eles o teste de toxicidade aguda em que não houve óbitos, apenas leve sonolência nos animais, indicando baixa toxicidade aguda. O extrato ainda demonstrou inibição da atividade fosfolipásica, proteolítica, inibição das atividades edematogênica provocadas pelo veneno e por carragenina.

As atividades hemorrágica, necrosante e miotóxica promovidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos também foram bloqueadas pelo extrato, sendo o pré-tratamento i.p. mais efetivo, corroborando com o uso profilático popular (ALVES, 2013).

2.3.3 Características químicas

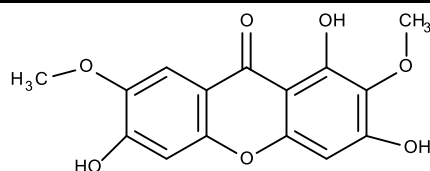
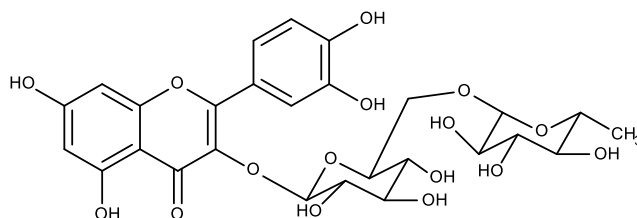
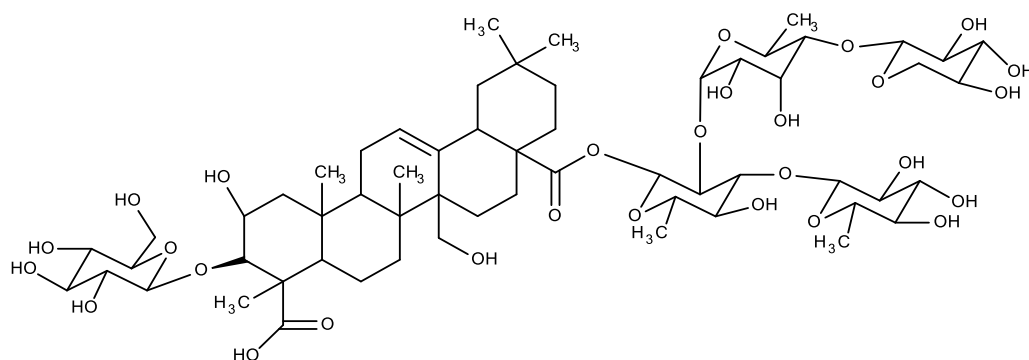
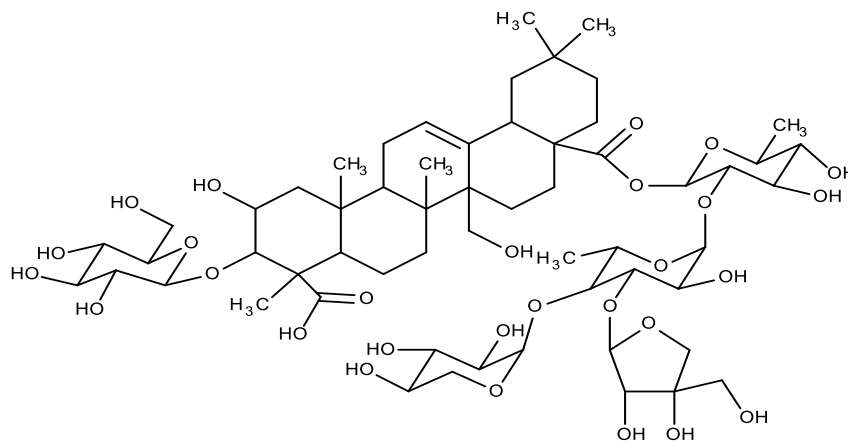
O estudo fitoquímico desta espécie é bastante amplo e os primeiros relatos na literatura datam de 1949, portanto várias classes de substâncias já foram identificadas e isoladas das suas raízes, como xantonas, saponinas e flavonóide, sendo mostradas no **Quadro 2**.

Quadro 2 – Substâncias isoladas da *Bredemeyera floribunda* Willd**1,3,7-trihidroxi-4,8-dimetoxixantona (3)**
SILVEIRA et al, 1995

1,7-

dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona (5)

SILVEIRA et al, 1995

**1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (4)**
SILVEIRA et al, 1995**Rutina (6)**
DAROS et al, 1996**Bredemeyerosídeo D (7)**
Atividade Antiofídica
PEREIRA et al, 1996**Bredemeyerosídeo C (8)**
Atividade Antiofídica
PEREIRA et al, 1996

Como se pode observar nas xantonas **3**, **4** e **5**, todas seguem o padrão pentaoxygenado da família Polygalacea. Ainda foi isolado o flavonóide Rutina, estrutura **6**. Além disso, até o presente momento foram isoladas três saponinas desta espécie, porém, só foi possível encontrar apenas duas estruturas na literatura, os Bredmeyerosídeos **7** e **8**. Todas essas saponinas foram identificadas como triterpenoides e o Bredmeyerosídeo B (estrutura não encontrada), assim como as outras, também possui atividade antiofídica comprovada.

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Um levantamento bibliográfico foi realizado no Scifinder acerca das substâncias já isoladas do gênero *Bredemeyera*, em que constavam isolamentos de apenas duas espécies: *Bredemeyera brevifolia* e *Bredemeyera floribunda*. Foram encontrados diversos ácidos graxos, flavonóide rutina, xantonas e saponinas (SILVEIRA e OLIVEIRA 2000, SILVEIRA et al., 1995; PEREIRA et al., 1996; DAROS et al., 1996).

Neste levantamento, observou-se que para este gênero, os dois principais grupos de metabólitos secundários são as saponinas e as xantonas. Abaixo, de forma simplificada, estão apresentados esses dois grupos com suas principais características, atividades biológicas e dados de RMN ¹³C para as substâncias isoladas do gênero, quando reportadas.

3.1 SAPONINAS

3.1.1 Aspectos gerais

As saponinas são uma classe de metabólitos secundários que possuem um grupo de glicosídeos de ocorrência natural mais amplamente distribuído no reino vegetal. Seu nome deriva da palavra latina “sapo” que significa sabão, refletindo a sua ampla capacidade de formar espumas estáveis em solução aquosa. Plantas que produzem saponinas o fazem como parte de seu desenvolvimento normal, no entanto, fatores ambientais diversos, tais como nutrientes, disponibilidade de água, irradiação de luz ou efeitos combinados podem influenciar no acúmulo de desse metabólito (AUGUSTIN et al., 2011).

Elas atuam como protetores, oferecendo blindagem contra patógenos e herbívoros no sistema de defesa da planta (AUGUSTIN et al., 2011). Portanto, são mais facilmente encontradas em plantas que são mais vulneráveis a ataques de fungos, bactérias ou insetos. As saponinas dividem-se em duas grandes classes que são triterpenóides (C₃₀) e esteróides (C₂₇). A caracterização de sua estrutura se dá através do número de unidades de açúcar ligadas covalentemente em posições diferentes. Além disso, este grupo apresenta um grande número de compostos biologicamente e farmacologicamente ativos. (LACAILLE-DUBOIS; MITAINE-OFFER, 2005).

Embora as saponinas tenham sido utilizadas por séculos como detergente doméstico (SPARG et al., 2004), devido a sua característica lipofílica com a presença de uma aglicona solúvel em lipídeo e das unidades solúveis em água nas cadeias laterais (GÜÇLÜ-ÜNTÜNDAĞ

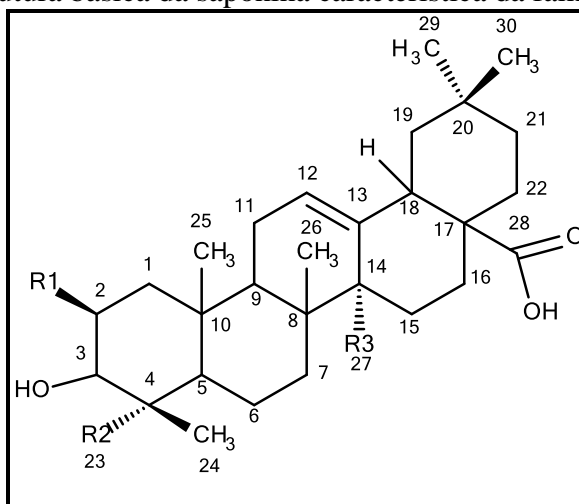
et al., 2007), as novas descobertas acerca das propriedades anticâncer das saponinas de origem vegetal tem intensificado as produções científicas na área. Além disso, as saponinas também são bastante conhecidas por possuírem complexos metálicos de ferro, zinco e cálcio (MILGATE; ROBETS, 1995). E ainda por serem utilizadas como surfactantes naturais em comidas servindo como conservantes controlando a deterioração microbiana dos alimentos. Recentemente, devido a sua propriedade de formação de espuma natural, as saponinas também vêm sendo alvo de estudo para aplicação como biotensioativo natural para melhorar as propriedades da superfície dos alimentos (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2013).

Do mesmo modo que a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética vêm utilizando as saponinas, outros tipos de indústrias também exploram o potencial desse metabólito. Elas o fazem através de subprodutos derivados da produção do petróleo ricos em saponinas, como vermífugo botânico gerindo seletivamente minhocas lançadas em campos de golfe e outros esportes (AUGUSTIN et al., 2011).

3.1.2 Saponinas da família Polygalaceae

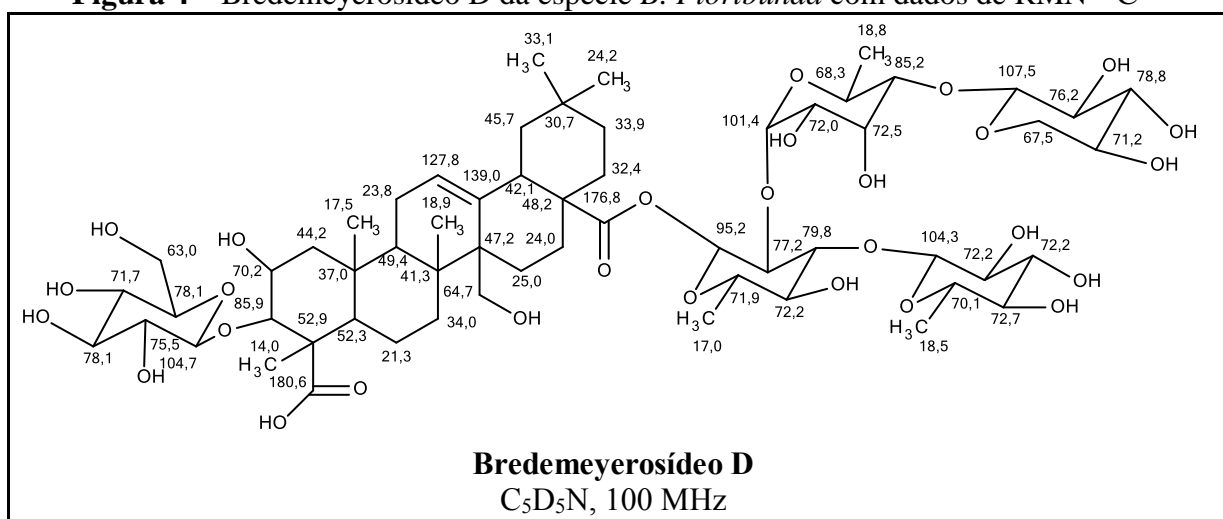
A maior parte das saponinas da família Polygalaceae foi isolada do extrato bruto das raízes das plantas obtido a partir de etanol/água 70%. O procedimento geralmente utilizado para o isolamento foi a cromatografia por exclusão molecular utilizando um polímero poroso na forma de gel Mitsubishi Diaion na coluna HP-20 e como eluente, metanol/água 50% em sucessivas eluições. E em seguida, o material obtido foi submetido à cromatografia com coluna semi-preparativa em fase reversa utilizando a CLAE, (LACAILLE-DUBOIS; MITAINE-OFFER, 2005).

Segundo Dubois, entre o período de 1992 – 2002 cerca de 100 saponinas foram isoladas e elucidadas com base em dados espectroscópicos. E as saponinas da família Polygalaceae possuem uma estrutura bem característica e intimamente relacionada, sendo triterpenóides pentacíclicos oxigenados, como mostra a **Figura 3**. Além disso, a maior parte é composta por glicosídeos bidesmosídicos baseadas em agliconas com uma ou duas glicoses em C₃ e de um a seis açúcares em C₂₈, sendo acilados pelo ácido *para*, di ou trimetoxicinâmico e/ou ácido acético (LACAILLE-DUBOIS; MITAINE-OFFER, 2005).

Figura 3 – Estrutura básica da saponina característica da família Polygalaceae

Fonte: próprio autor, 2015

Três saponinas já foram isoladas da espécie *B. floribunda*, sendo conhecidos como Bredemeyerosídeos B, C e D. Destes, não foi encontrado a estrutura do Bredemeyerosídeo B, bem como, os dados de RMN ^{13}C para a estrutura do Bredemeyerosídeo C na literatura. Apenas para o Bredemeyerosídeo D, foram encontrados dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C e estão dispostos na **Figura 4**. Para todos eles, a atividade antiofídica foi comprovada e registrada na literatura (PEREIRA et al., 1996).

Figura 4 – Bredemeyerosídeo D da espécie *B. Floribunda* com dados de RMN ^{13}C 

Fonte: próprio autor, 2015

Dos dados de RMN ^{13}C apresentados acima, é possível observar os deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 se destacarem, o carbono 12 (δ 127,8) e o carbono 13 (δ 139,0) são bastante característicos das saponinas encontradas na família Polygalaceae. Além disso, as carbonilas de éster (δ 176,8) e de ácido carboxílico (δ 180,6) são frequentemente encontradas

nessas estruturas. É possível destacar ainda a ocorrência de carbonos anoméricos nas unidades de carboidratos em δ 101,4; 104,3; 104,7 e 107,5. Os demais deslocamentos são bastante comuns aos carbonos sp^3 , estando compreendidos entre δ 14 e 52 e carbonos oxigenados entre δ 63 e 95.

3.1.3 Rota Biosintética de saponinas triterpênicas

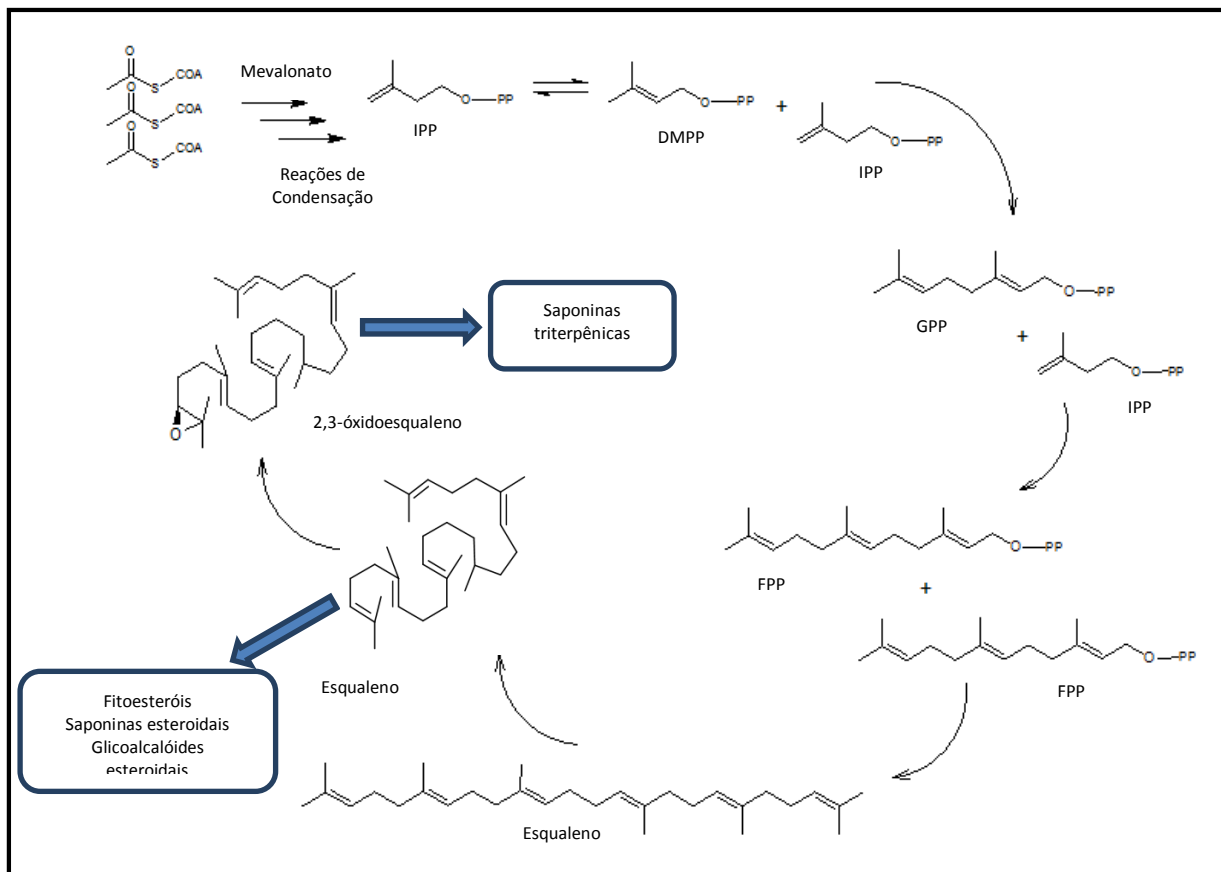
Ainda hoje, a disponibilidade de saponinas depende da capacidade de extração a partir das plantas. Porém, o fornecimento constante de uma quantidade suficiente de saponinas não é viável. A biotecnologia de produção de qualquer saponina completa, que não é facilmente acessível, pode contornar a limitação da disponibilidade natural, por isso se faz necessário o conhecimento da biosíntese desse metabólito (AUGUSTIN et al., 2011).

3.1.3.1 A partir de acetil-CoA até 2,3-oxidosqualeno

As ideias atuais sobre a biossíntese de saponinas nas plantas consideram que elas sejam derivadas do metabolismo do fitosterol. O fragmento do metabolismo das saponinas triterpênicas que é idêntica a síntese de esteróis em plantas está descrita na **Figura 5**. Nas plantas, o isopentenil pirofosfato (IPP) e o dimetilalil pirofosfato (DMPP) derivam da rota de condensação de acetil-CoA pela via do mevalonato ou da rota a partir do piruvato e do D-gliceraldeído, num processo mediado pela coenzima tiamina difosfato (TPP) (AUGUSTIN et al., 2011).

A ligação de duas unidades de farnesil pirofosfato (FPP) leva à formação do esqualeno (C_{30}), o qual é posteriormente transformado em 2,3-epóxido de esqualeno (C_{30}) (AUGUSTIN et al., 2011).

Figura 5 – Primeiro fragmento na biossíntese de saponinas triterpênicas que leva ao precursor 2,3-epóxido de esqualeno



* IPP: Isopentenil pirofosfato; DMPP: Dimetilalil pirofosfato; GPP: Geranil pirofosfato; FPP: Fasnil pirofosfato. Adaptado de AUGUSTIN et al., 2011

Fonte: próprio autor, 2015

3.1.3.2 Ciclização do 2,3-epóxido de esqualeno

O segundo passo envolvido na biossíntese de saponinas triterpenóides é a ciclização do 2,3-epóxido de esqualeno. Assim, o elevado número de possibilidades de se estabelecer diferentes ligações internas durante esse processo dá origem a uma vasta gama de diferentes estruturas e mais de 100 esqueletos diferentes já encontrados na natureza (XU et al., 2004). Porém, as enzimas que catalisam esta reação limitam as possibilidades de ciclização possíveis, limitando portanto, o número de saponinas (**Figura 6**) e são denominadas esqualeno-sintase (OSC, do inglês oxido squalene cyclase).

As enzimas esqualeno-sintase possuem os três principais pré-requisitos para catalisar o processo de ciclização:

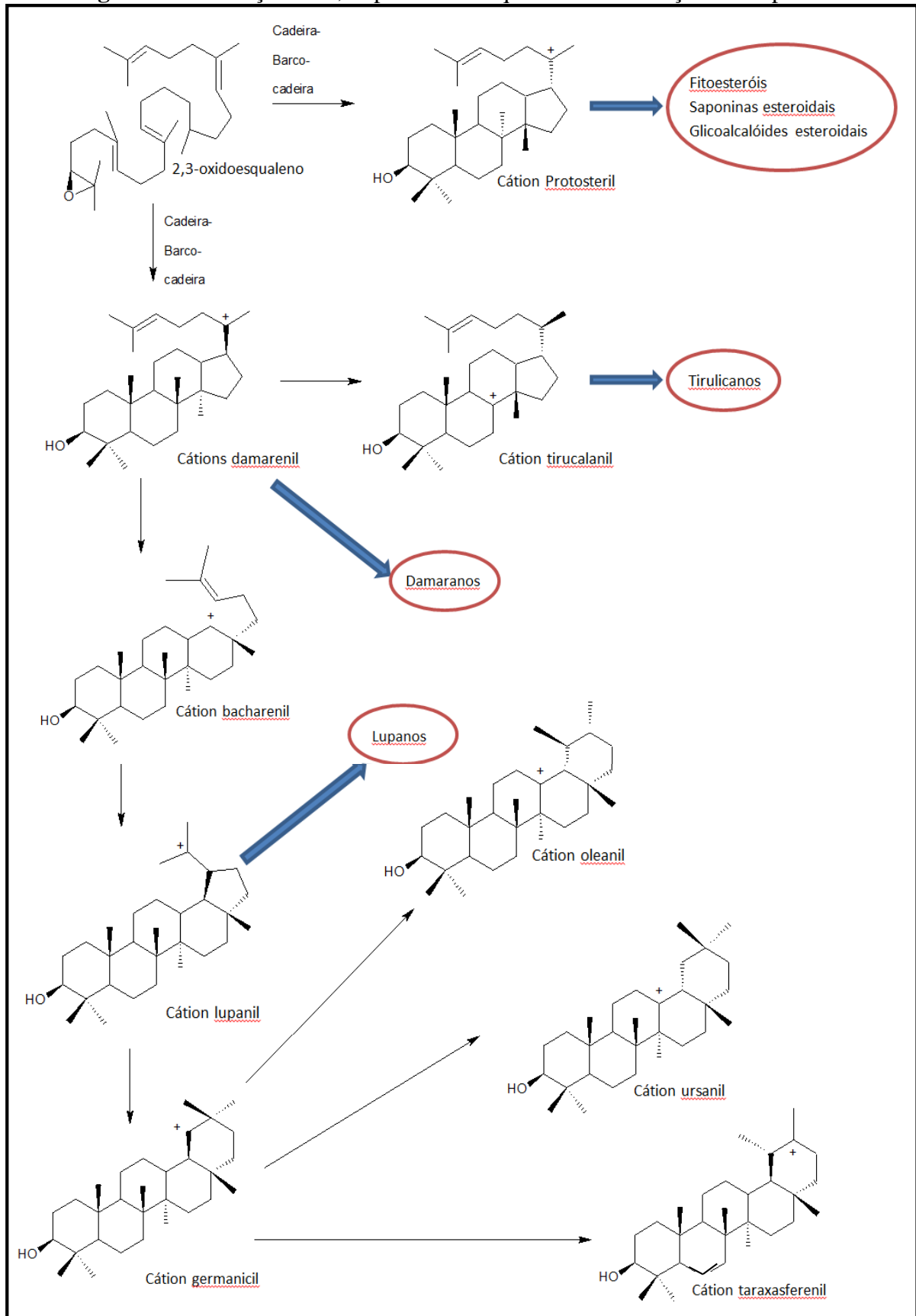
- ✓ São catalisadores ácidos que iniciam o processo de ciclização por protonação do 2,3-epóxido de esqualeno;

- ✓ Possuem uma cavidade catalítica especializada que limita espacialmente o sítio ativo, orientando o esqueleto do epóxido de esqualeno ciclizante através de etapas intermediárias definidas que provavelmente levam a formação de produtos de ciclicização finais específicos;
- ✓ Blindam os intermediários reativos durante o processo de ciclicização a fim de evitar interferências de reações secundárias (AUGUSTIN et al., 2011).

O término da ciclicização é ocasionado provavelmente pelo resultado da desprotonação por resíduos de aminoácidos polares que atuam como catalisadores básicos ou devido a moléculas de água localizadas no centro ativo. Porém, a “orientação” do anel ciclizante em todas as etapas intermediárias, bem como a desprotonação específica ao final do processo ainda vem sendo investigada. Assim, com o aumento da sensibilidade das técnicas de detecção, revelou-se a tendência de algumas dessas enzimas de ciclicização (OSC) de darem origem a produtos secundários, além dos produtos principais. Um exemplo disso, é o trabalho publicado em 2007 por Lodeiro e colaboradores, em que eles conseguiram identificar 22 subprodutos além do produto principal (90 %) de *Arabidopsis thaliana* (LODEIRO et al., 2007).

A principal característica da ciclicização por OSC envolvida na biossíntese de saponinas triterpênicas está na conformação inicial do 2,3-epóxido de esqualeno (cadeira-cadeira-cadeira), de outro modo, quando a conformação inicial é cadeira-bote-cadeira durante a catálise por OSC, formam-se saponinas esteróidais (AUGUSTIN et al., 2011).

Figura 6 - Ciclização do 2,3-epóxido de esqualeno e a formação das saponinas



*adaptado de AUGUSTIN et al., 2011

Fonte: próprio autor, 2015

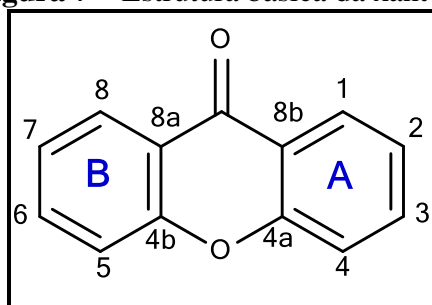
3.2 XANTONAS

3.2.1 Aspectos gerais

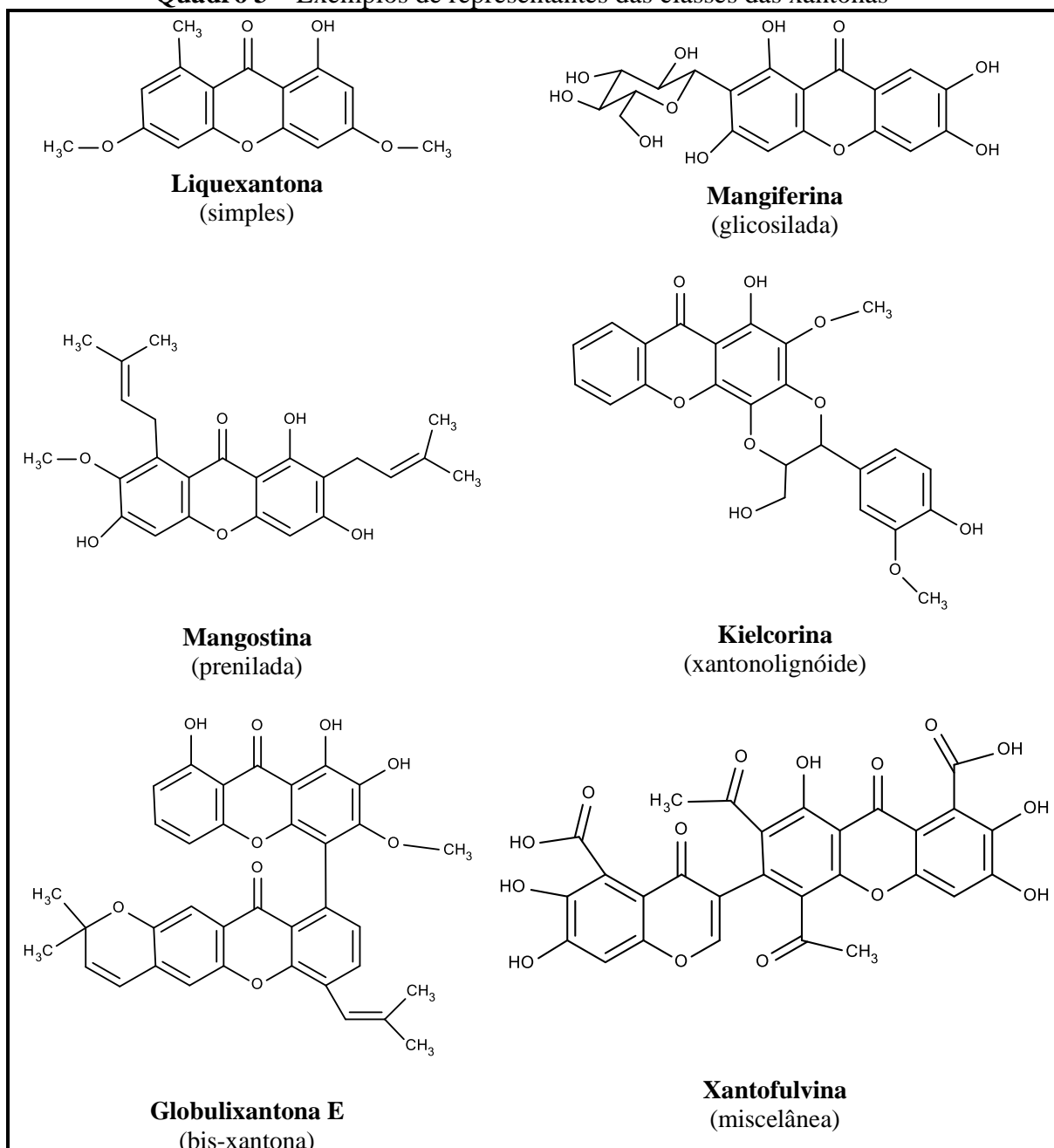
Xantonas são metabólitos secundários polifenólicos com três anéis simples comumente encontrados em plantas superiores das famílias Polygalaceae, Gentianaceae, Guttiferae e Leguminosae, além de fungos e líquens (YANG et al., 2012). Devido a simetria natural de seu núcleo, as xantonas são numeradas de acordo com a convenção biossintética. Os carbonos 1-4, derivados do acetato, pertencem ao anel A, os carbonos 5-8, derivados do chiquimato pertencem ao anel B, como mostra a **Figura 7**. Elas possuem incontáveis atividades biológicas e medicinais, como bactericida, antiviral, antioxidativa, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antitrombótica, anticâncer, citotóxica, coagulante, antifúngica, entre outras (PERES; NAGEM, 1997).

A maioria das xantonas e seus derivados obtidos de plantas foram isolados através de extração com solventes e várias cromatografias de coluna. Os extratos utilizados foram feitos em sua maioria utilizando como solvente etanol ou metanol e cromatografados em coluna comum. As frações obtidas passaram por nova coluna cromatográfica de exclusão molecular até a total purificação do composto. Para o isolamento de xantonas glicosiladas utilizou-se principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência, usando como solventes metanol/água e acetonitrila/água (YANG et al., 2012).

Figura 7 – Estrutura básica da xantona



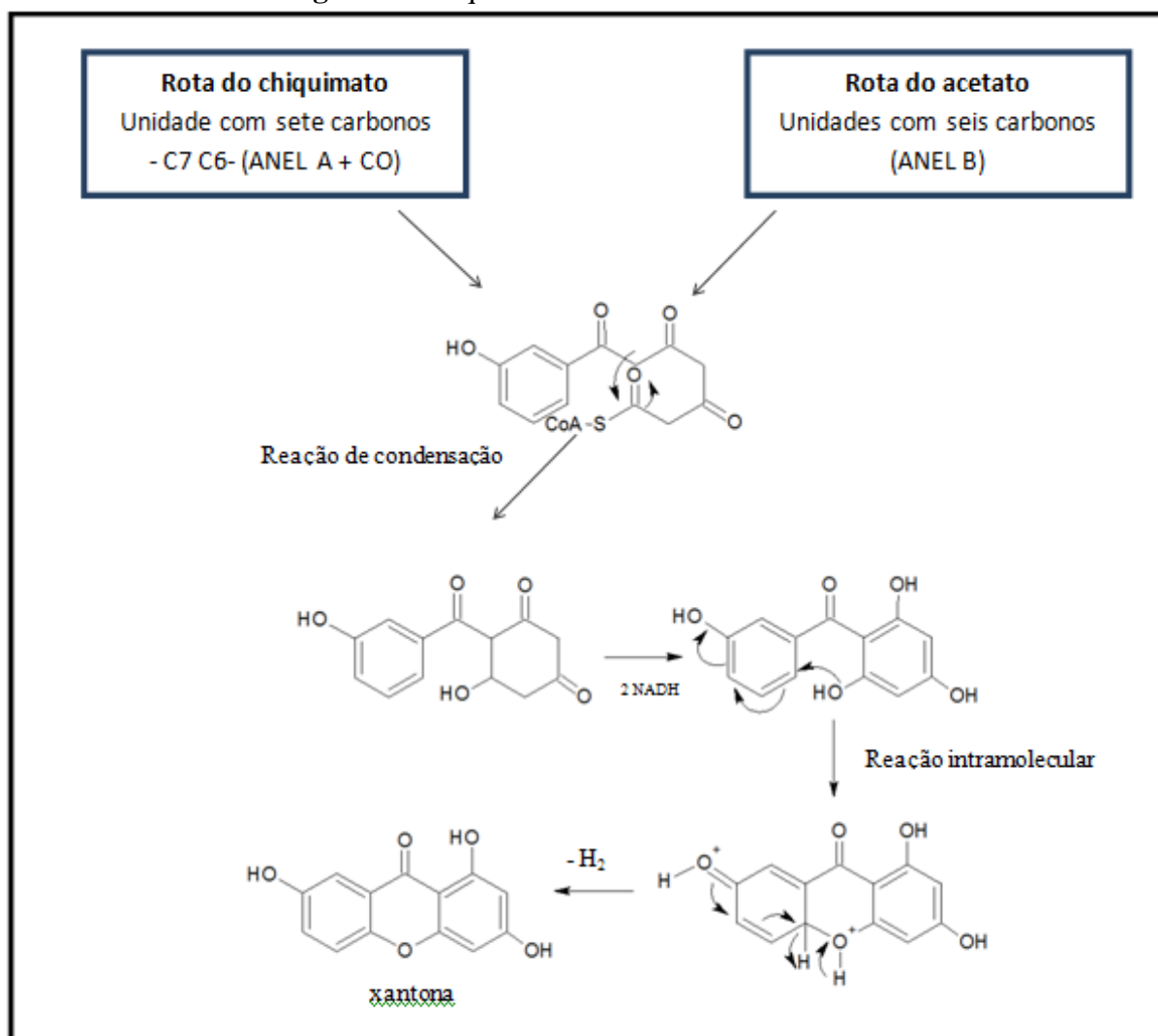
As xantonas são classificadas segundo a natureza de seus substituintes, podendo ser divididas em seis grandes grupos: xantonas simples, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas, xantonolignóides, bisxantonas e xantonas miscelâneas (VIEIRA; KIJJOA, 2005), conforme exemplificado no **Quadro 3**.

Quadro 3 – Exemplos de representantes das classes das xantonas

Fonte: próprio autor, 2015

A via biossintética de xantonas não ocorre de uma única maneira e nem é uma via biossintética simples. Dessa forma, inúmeros mecanismos de biossíntese já foram propostos (CORREA, 2009). Um desses mecanismos sugere que as xantonas de plantas superiores são formadas por uma rota mista via chiquimato em conjunto com acetato. As benzofenonas são precursoras das xantonas e a principal etapa do mecanismo biossintético da formação de xantonas é a formação do esqueleto de 13 carbonos da benzofenona intermediária. Esta sofre reação intramolecular para formação das xantonas, conforme mostra a **Figura 8** (PERES; NAGEM, 1997).

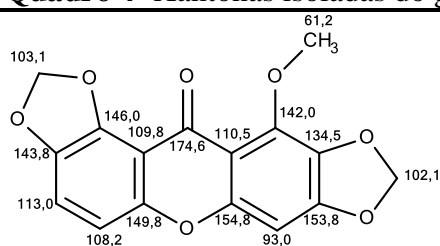
Figura 8 – Esquema de biossíntese de xantonas



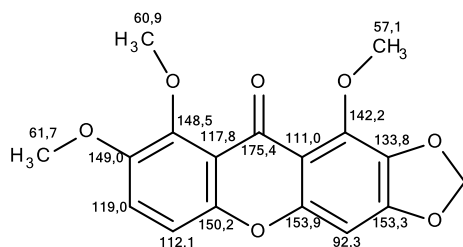
Fonte: próprio autor, 2015

Do gênero *Bredemeyera*, foram isoladas 5 xantonas, duas das quais foram isoladas de *Bredemeyera brevifolia* e três foram isoladas de *Bredemeyera floribunda*. No **Quadro 4** estão apresentadas as xantonas relatadas na literatura com seus dados de RMN ¹³C para este gênero (SILVEIRA, OLIVEIRA 2000, SILVEIRA et al, 1995).

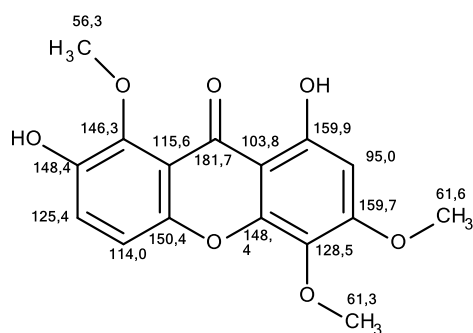
Como pode ser observado, as xantonas desse gênero seguem claramente o padrão pentaoxygenado, característico da família Polygalaceae. Os dados de RMN ¹³C das estruturas abaixo mostram nitidamente absorções características de 13 carbonos sp², sendo um com deslocamento em campo mais baixo, característico de carbonila de cetona. Ainda é possível assinalar as absorções características de grupos metoxila acima de δ 60,0 para grupos impedidos estericamente e abaixo de δ 60 para grupos desimpedidos estericamente (SILVEIRA, OLIVEIRA 2000, SILVEIRA et al., 1995).

Quadro 4- Xantonas isoladas do gênero *Bredemeyera* com dados de RMN ^{13}C 

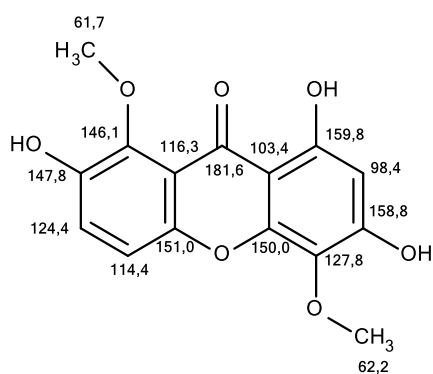
B. brevifolia
CDCl₃, 100 MHz



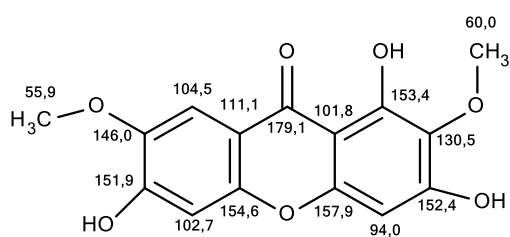
B. brevifolia
CDCl₃, 100 MHz



B. floribunda
C₅D₅N, 100 MHz



B. floribunda
Acetona-d, 100 MHz



B. floribunda
DMSO-d, 100 MHz

Fonte: próprio autor, 2015

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o conhecimento da composição química, bem como atividade biológica/ farmacológica da espécie *Bredemeyera floribunda* Willd.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Preparar extratos orgânicos e aquosos das raízes de *Bredemeyera floribunda*;
- ✓ Particionar os extratos orgânicos obtidos por meio de partição líquido/líquido e/ou cromatografia em gel de sílica;
- ✓ Identificar os metabólitos secundários presentes nas frações;
- ✓ Isolar esses metabólitos através de métodos apropriados, como: CC, Sephadex e CLAE;
- ✓ Elucidar estruturalmente os compostos isolados por meio de técnicas espectroscópicas como RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, métodos físicos, como o ponto de fusão e comparação com a literatura.
- ✓ Avaliar a atividade antihemorrágica e proteolítica do extrato, frações e substâncias isoladas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL VEGETAL

As raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd utilizadas no estudo foram coletadas na chapada Araripe, Ceará, em março de 2013. A planta foi identificada por comparação com um espécime de *B. floribunda*, coletado em Julho de 2001 em Macaíbas, Crato, Ceará, e depositado no Herbário Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, com Nº de exsicata 30844.

Após a coleta, o material foi submetido à secagem e trituração para devida armazenagem.

5.2 METÓDOS CROMATOGRÁFICOS

5.2.1 Cromatografia de Adsorção

Nas cromatografias de adsorção foram empregadas gel de sílica 60 (\AA μm 63-100) e nas cromatografias de adsorção sob pressão média “flash” foram utilizadas sílica (\AA μm 40-63) da Ultra Chem. O diâmetro e o comprimento das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostra e de sílica empregadas. As colunas utilizadas na cromatografia “flash” foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no cume, a fim de armazenar o solvente.

Para cromatografia de camada delgada (CCD) foram utilizadas placas cromatográficas de gel de sílica 60 (\AA μm 2-25) sobre poliéster T-6145 da Sigma Chemical CO (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). Como eluentes foram utilizados hexano (C_6H_{14}), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH), água (H_2O) e ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) puros ou combinados em proporções crescente de polaridade.

A revelação das substâncias nas placas cromatográficas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em equipamento artesanal e/ou com aspersão em solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e ácido perclórico (HClO_4) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), seguido de aquecimento em chapa por cerca de 5 minutos, ou ainda por exposição a vapores de iodo.

5.2.2 Cromatografia de Exclusão Molecular

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol puro.

5.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em aparelho da marca Shimadzu. O modelo utilizado foi a série prominence, constituído de um desgaseificador DGU-20A5, uma bomba LC-20AT, sistema de injeção automática SIL-20HT, forno CTO-20A, um detector SPD-M20A e uma interface CBM-20A. As separações foram efetuadas em coluna XTerra® RP-18 (10 x 250 mm, 10 µm), mantidas num forno termostático a 35°C. Adotando-se o fluxo de 3,0 mL/min para desenvolvimento do método e coleta.

Os solventes empregados apresentavam grau de pureza adequado para CLAE (MeOH e H₂O) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Phenomenex) e desgaseificados por sonicação a vácuo durante 15 min. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 µm (Waters).

5.3. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

5.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono-13 (RMN ¹³C) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance, DPX-300 e/ou DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC).

O espectrômetro DRX-300, equipado com sonda de detecção inversa de 5 mm e magneto de 7,0 T, foi operado nas frequências de 300,13 e 75,47 MHz para hidrogênio e carbono, respectivamente. Nos experimentos realizados no DRX-500, foram aplicadas frequências de 499,3 MHz (¹H) e 125,6 MHz (¹³C), sob um campo magnético de 11,7 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais) e sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais).

As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado: clorofórmio (CDCl_3), água (D_2O), dimetilssulfóxido (DMSO) ou piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), comercializados pela companhia TEDIA BRAZIL.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de Hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27), água (δ 4,82), dimetilssulfóxido (δ 2,49) e piridina (δ 8,74; 7,58; 7,22). Nos espectros de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23), dimetilssulfóxido (δ 39,5) e piridina (δ 150,35; 135,91; 123,87).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete).

Nos experimentos de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros de aquisição: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, intervalo para relaxação de 1 s e largura de pulso de 90° de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento, enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento. Predição linear para o processamento 2D, utilizando 80 coeficientes, foi usada quando necessária. O número de transientes variou de 8, para ^1H , a 16384, para ^{13}C , para os experimentos unidimensionais, e 2^n ($n \geq 2$) para bidimensionais, dependendo do experimento e quantidade de amostra disponível.

Os microprogramas utilizados para a aquisição dos dados foram: ^1H (zg), ^{13}C CPD (zgpg), ^{13}C -DEPT 135 (zgpg30), gs-COSY (cosygp), gs-HSQC (hsqcgpqh), gs-HMBC (hmbclpndqf) e gs-HMQC (hmqcqh).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), com ângulos de nutação de 135° , CH e CH_3 com amplitudes positivas em oposição aos CH_2 , foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135 do espectro CPD.

Os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (HSQC e HMBC), realizados no aparelho Bruker Avance DRX-500, foram efetuados em sonda

multinuclear de 5 mm, com detecção inversa, empregando-se gradiente de campo, posicionado no eixo z e magnitude de 10 A. Os valores de J utilizados para os experimentos pertinentes foram $^1J_{H,C} = 145$, $^nJ_{H,C} = 7$, onde $n \geq 2$.

5.4 MÉTODOS FÍSICOS DE ANÁLISE

5.4.1 Determinação do ponto de fusão (Pf)

Os pontos de fusão foram determinados em equipamento da empresa MicroQuímica Ind. E Com. Ltda, modelo MQAPF-301, composto por uma placa aquecedora e uma unidade de processamento, a uma taxa de aquecimento de 2 °C/min.

5.5 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Bredemeyera floribunda* Willd

Para o estudo fitoquímico foram preparados extratos das raízes da espécie coletada *B. floribunda*. As raízes foram submetidas à extração exaustiva com hexano, etanol, metanol/água (50:50) e água à temperatura ambiente. Cada solução resultante foi filtrada e o solvente foi destilado em evaporador rotativo sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C, para obtenção dos respectivos extratos como descrito na **Tabela 2**.

Todas as tabelas que constam nesse procedimento experimental foram elaboradas pelo próprio autor, 2015 do trabalho.

Tabela 2 - Dados da obtenção dos extratos de *B. floribunda*

Extratos*	Material Vegetal (g)	Extrato (g)	Rendimento %
BFRE	100	7	7
BFRE-1	100	7	7
BFRE-2	350	28	9
BFRAQ	100	13	13
BFRMA	100	18,8	18,8

* BFRE: extrato etanólico das raízes de *B. floribunda*, BFRE-1: segundo extrato etanólico das raízes, BFRE-2: terceiro extrato etanólico das raízes, BFRAQ: extrato aquoso das raízes, BFRMA: extrato metanol/água (50:50) das raízes.

10 mg do extrato etanólico (BFRE) foram submetidos à análise por RMN e seu espectro de RMN 1H foi analisado para caracterização preliminar do extrato.

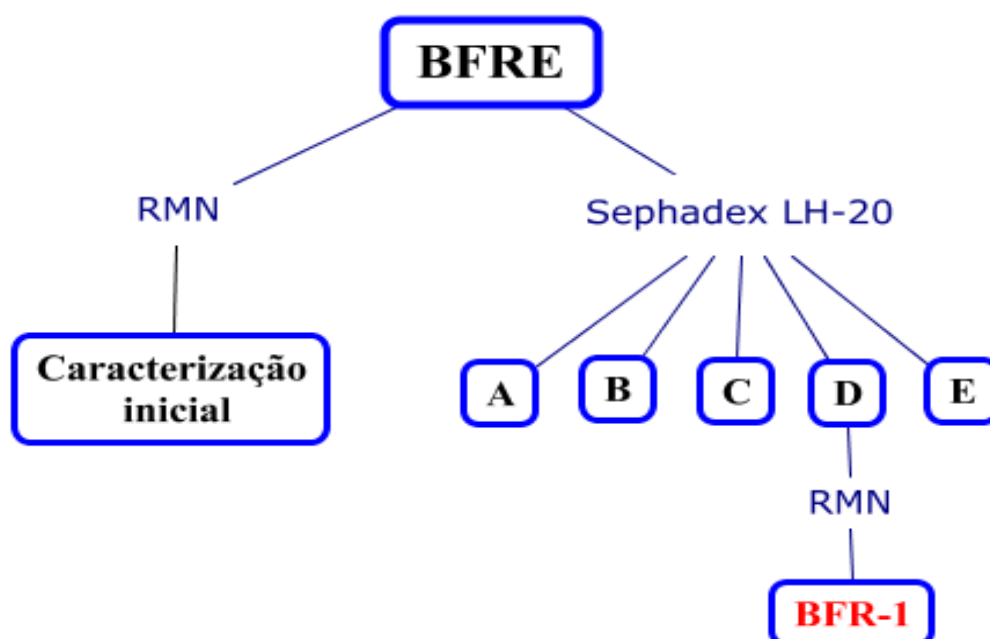
5.5.1 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das raízes de *B. floribunda* (BFRE, BFRE-1 e BFRE-2)

Foi realizado um fracionamento inicial, no qual 6,0 g de extrato etanólico da raiz de *B. floribunda* (BFRE) foram submetidos à cromatografia por exclusão molecular. Foram realizadas duas colunas utilizando 90,0 g de Sephadex LH-20 em uma coluna de 4,0 cm de diâmetro. Após analisar as frações por CCD, utilizando como eluente hexano/AcOEt (50:50), as mesmas foram reunidas, resultando em 5 frações que estão disposta na **Tabela 3**. Estas frações foram analisadas por RMN ^1H para caracterização química inicial do extrato, após análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , constatou-se que a fração BFRE-D tratava-se de um flavonóide isolado, denominado **BFR-1**. Os procedimentos utilizados na obtenção de BFR-1 estão descritos no **Fluxograma 1**, pag. 49.

Tabela 3 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE

Frações	Massa (g)
BFRE-A	2,00
BFRE-B	0,20
BFRE-C	0,45
BFRE-D	1,30
BFRE-E	1,70
Total:	5,65
Rendimento:	94,16%

Outro fracionamento foi realizado no qual 7,0 g de extrato etanólico da raiz de *B. floribunda* (BFRE-1) foram dissolvidos em 30 mL de metanol e submetidos à cromatografia por exclusão molecular. Foram realizadas cinco colunas que acondicionavam 90,0 g de Sephadex LH-20 em uma coluna de 4,0 cm de diâmetro, rendendo 22 frações na primeira coluna, 21 na segunda, 22 na terceira, 21 na quarta e 52 frações na quinta coluna. As frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, utilizando como eluente hexano/AcOEt (50:50) e resultando em 9 frações **Tabela 4**, pag. 48.

Fluxograma 1 – Procedimentos utilizados na obtenção de BFR-1**Tabela 4** - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-1

Frações*	Massa (g)
BFRE-1A (1 : 1-3; 2 : 1; 5 : 1-2)	0,84
BFRE-1B (3 : 1; 4 : 1-6)	0,93
BFRE-1C (1 : 4-5; 2 : 2-4; 3 : 2-4)	1,38
BFRE-1D (1 : 6/8-19; 2 : 5-12/17; 3 : 5-12/21-22; 4 : 7-14/17-19; 5 : 3-4/17-28)	2,21
BFRE-1E (1 : 7; 5 : 5-16)	1,32
BFRE-1F (3 : 17-18; 4 : 15-16)	0,03
BFRE-1G (2 : 13-16/18-19; 3 : 13-16/19-20)	0,1
BFRE-1H (5 : 47-52)	0,01
BFRE-1I (1 : 20-22; 2 : 20-21; 4 : 20-21; 5 : 29-46)	0,1
Total:	6,92
Rendimento:	98,86%

* Os números escritos em negrito indicam o número da coluna e os números sem negrito indicam o número da fração.

Posteriormente, 10,0 g de BFRE-2 também foram submetidas à cromatografia por exclusão molecular. Foram realizadas 3 colunas que acondicionavam 90,0 g de Sephadex LH-20 em uma coluna de 4,0 cm de diâmetro que renderam 66 frações na primeira, 70 frações na segunda e 55 frações na terceira. As frações foram reunidas de acordo com as semelhanças

observadas em CCD quando eluídas com hexano/AcOEt (70:30), resultando em 8 frações apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2

Frações*	Massa (g)
BFRE-2A (1 : 1-26; 2 : 5-38)	5,78
BFRE-2B (2 : 1-4; 3 : 1-6)	0,37
BFRE-2C (1 : 27-36)	0,17
BFRE-2D (2 : 39-50; 3 : 7-30)	2,76
BFRE-2E (3 : 31-36)	0,18
BFRE-2F (2 : 51-60; 3 : 37-55)	0,31
BFRE-2G (1 : 37-66)	0,05
BFRE-2H (2 : 61-70)	0,02
Total:	9,64
Rendimento:	96,40%

* Os números escritos em negrito indicam o número da coluna e os números sem negrito indicam o número da fração.

5.5.1.1 Fracionamento cromatográfico de BFRE-1D

2,21 g da fração BFRE-1D foram adsorvidos em 4,44 g de gel de sílica 60 (\AA μm 63-100) e foi submetida à cromatografia em coluna aberta (Φ 3,0 cm), utilizando-se 11 cm de altura com 15,67 g de sílica. Foram utilizados os solventes hexano, AcOEt e metanol para eluição gradiente em que a polaridade foi aumentada gradativamente conforme demonstrado na **Tabela 6**. Neste procedimento foram obtidas 35 frações colhidas a cada 50 mL e secas em evaporador rotativo à temperatura de 40 °C.

A fração 5 apresentou um precipitado branco e a fração 7 apresentou um precipitado amarelo, os quais foram submetidos a recristalização com clorofórmio, resultando em 6 mg e 7,5 mg de um sólido branco e outro amarelo, denominados **BFR-2** (composto 1 isolado da raiz de *B. floribunda*) e **BFR-3** (composto 2, isolado da raiz de *B. floribunda*) respectivamente. A análise por CCD (solvente: Hexano/AcOEt 40 %) revelou uma mancha homogênea, visível na luz UV (254 nm). **BFR-2** e **BFR-3** foram estruturalmente caracterizados através de técnicas espectroscópicas como sendo um derivado cinâmico e uma xantona, respectivamente.

Tabela 6 - Dados referentes à eluição utilizado no fracionamento cromatográfico de BFRE-1D

Fração	Eluente	Volume (mL)
1	Hexano/AcOEt 5 %	50
2 – 4	Hexano/AcOEt 15 %	150
5 – 8	Hexano/AcOEt 25 %	200
9 – 11	Hexano/AcOEt 35 %	150
12	Hexano/AcOEt 45 %	50
13	Hexano/AcOEt 55 %	50
14 – 17	Hexano/AcOEt 70 %	200
18	AcOEt 100 %	50
19	AcOEt/MeOH 5 %	50
20 – 23	AcOEt/MeOH 30 %	200
24 – 26	AcOEt/MeOH 50 %	150
27 – 33	AcOEt/MeOH 80 %	350
34 -35	MeOH 100 %	100

Após submeter a fração 20 à recristalização com metanol foi obtido um precipitado branco (35,2 mg), denominado **BFR-6**. Após análise por RMN, a estrutura foi caracterizada como sendo um carboidrato.

A análise comparativa por CCD possibilitou a reunião das frações semelhantes, cujo resultado encontra-se na tabela (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-1D

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
BFRE-1D1 (1 - 4)	12,3	BFRE-D5 (12 - 16)	24,7
BFRE-1D2 (5)	44,4	BFRE-D6 (17 - 22)	1244,6
BFRE-1D3 (6 - 8)	14,4	BFRE-D7 (23 - 30)	365,7
BFRE-1D4 (9)	24,4	BFRE-D8 (31 - 35)	2,3
Total:			1732,8
Rendimento:			78,41%

5.5.1.2 Fracionamento cromatográfico de BFRE-1E

A fração BFRE-1E (1,32 g) foi adsorvida em 3,0 g de gel de sílica 60 (Å μm 63-100) e cromatografada em coluna aberta (Φ 3,0 cm), utilizando-se 11 cm de altura com 15,93 g de

sílica. Foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) para eluição gradiente em que a polaridade foi aumentada gradativamente de acordo com o comportamento do material. Neste procedimento foram obtidas 22 frações de 50 mL cada, e secas em um evaporador rotativo (**Tabela 8**).

A fração 2 apresentou um precipitado branco que foi separado do restante da fração e estruturalmente caracterizado através de técnicas espectroscópicas como sendo o derivado cinâmico **BFR-2** (5,8 mg).

A análise comparativa por CCD em que o eluente variou de hexano/AcOEt (60:40) a AcOEt/MeOH (70:30) possibilitou a reunião das frações semelhantes, cujo resultado encontra-se na tabela **Tabela 9**.

Tabela 8 - Dados referentes a eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-1E

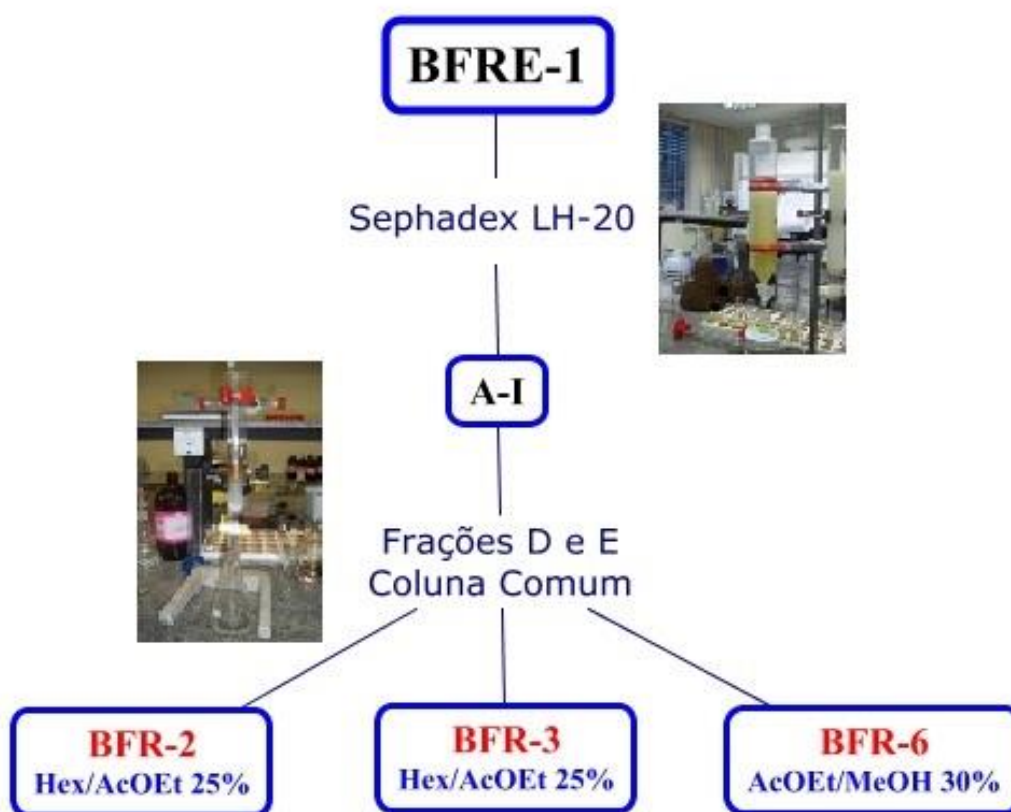
Fração	Eluente	Volume (mL)
1	Hexano/AcOEt 15 %	50
2	Hexano/AcOEt 25 %	50
3	Hexano/AcOEt 35 %	50
4	Hexano/AcOEt 40 %	50
5 – 6	Hexano/AcOEt 50 %	100
7	Hexano/AcOEt 70 %	50
8	Hexano/AcOEt 80 %	50
9	AcOEt 100 %	50
10	AcOEt/MeOH 10 %	50
11 – 14	AcOEt/MeOH 30 %	200
15 – 19	AcOEt/MeOH 50 %	250
20	AcOEt/MeOH 70 %	50
21 – 22	MeOH 100 %	100

Os procedimentos experimentais relacionados à BFRE-1 estão descritos no **Fluxograma 2**.

Tabela 9 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-1E

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
BFRE-1E1 (1 - 4)	70,8	BFRE-E6 (10)	97,1
BFRE-1E2 (5)	57,1	BFRE-E7 (11 - 12)	508,7
BFRE-1E3 (6)	11,5	BFRE-E8 (13 e 15)	120,7
BFRE-1E4 (7)	4,2	BFRE-E9 (14)	61,2
BFRE-1E5 (8 - 9)	2,4	BFRE-E10 (16 - 22)	92,7
		Total:	1026,4
		Rendimento:	77,70%

Fluxograma 2 – Procedimentos realizados com o extrato BFRE-1 até o isolamento de BFR-2, BFR-3 e BFR-6



5.5.1.3 Fracionamento cromatográfico de BFRE-2A

2,7 g de BFRE-1A foram submetidas à cromatografia de adsorção sob pressão média “flash” ($\text{AE } \mu\text{m } 40\text{-}63$), em que 17,0 g de sílica foi acondicionada com hexano numa coluna de 21 cm de altura e 2 cm de diâmetro. A eluição foi feita de modo gradiente, aumentando-se

gradativamente a polaridade e os solventes utilizados foram hexano, AcOEt, MeOH e água. Este procedimento rendeu 126 frações e os dados deste procedimento estão mostrados na **Tabela 10**, pag. 53. Após serem analisadas em CCD com eluentes variando entre hexano/AcOEt (80:20) e MeOH/H₂O (30:70) com adição de 5 gotas de ácido acético, as frações foram reunidas segundo mostra a **Tabela 11**.

Tabela 10 – Dados referentes à eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-2A

Frações	Eluente da coluna	Volume (mL)
1-10	Hex/ AcOEt 20 %	150
11-18	Hex/ AcOEt 20 %	100
19-22	AcOEt/MeOH 10 %	50
23-26	AcOEt/MeOH 30 %	50
27-29	AcOEt/MeOH 30 %	50
30-59	AcOEt/MeOH 30 %	300
60-90	AcOEt/MeOH 30 %	250
91-101	AcOEt/MeOH 30 %	100
102-106	AcOEt/MeOH 50 %	50
107-111	AcOEt/MeOH 70 %	50
112-117	AcOEt/MeOH 70 %	50
118-122	MeOH/H ₂ O 40 %	50
123-126	MeOH/H ₂ O 70 %	50

Tabela 11 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2A

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
BFRE-2A1 (1 - 2)	0,2	BFRE-2A8 (54 - 61)	0,08
BFRE-2A2 (3 - 6)	0,06	BFRE-2A9 (62 - 87)	0,8
BFRE-2A3 (7 - 29)	0,02	BFRE-2A10 (88 - 94)	0,03
BFRE-2A4 (30 - 33)	0,08	BFRE-2A11 (95 - 98)	0,02
BFRE-2A5 (34 - 39)	0,6	BFRE-2A12 (99 - 119)	0,04
BFRE-2A6 (40 - 51)	0,18	BFRE-2A13 (120 - 126)	0,01
BFRE-2A7 (52 - 53)	0,07	BFRE-2A8 (54 - 61)	0,08
Total:			2,19
Rendimento:			81,10%

5 mg da fração BFRE-2A8 foi utilizada para obter o espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN ^{13}C revelou que esta fração era muito promissora por indicar a presença de saponina triterpênica, classe de compostos com promissor potencial biológico. Sendo assim, esta fração foi encaminhada para análise por CLAE e apresentou boas condições de separação, tanto que foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico.

5.5.1.3.1 Fracionamento cromatográfico de BFRE-2A8

A fração BFRE-2A8 (75 mg) foi dissolvida em 2 mL de uma mistura de solventes (MeOH/H₂O 50 %), filtrada e submetida a análise por CLAE, utilizando coluna semi-preparativa RP-18 (10 x 250 mm, 10 μm) e operando de modo reverso, mantidas num forno termostático a 35°C. A análise preliminar sugeriu um método com resolução para separação cromatográfica, utilizando eluição isocrática com uma mistura de solventes MeOH/H₂O (15:85) com fluxo de 3mL/min, injetando-se 20 μL de amostra. Este método foi reproduzido em loop de 100 μL para realizar a coleta das amostras.

O cromatograma da fração em 200 nm mostrou dois picos dentados com tempo de retenção de 3 min (pico 1) e 3,5 min (pico 2) que foram coletados separadamente, além de se coletar também o rejeito da amostra. A fração correspondente ao pico 1 não apresentou massa suficiente para obtenção do espectro de RMN e a fração correspondente ao pico 2, após análise por RMN ^1H e ^{13}C revelou ser o carboidrato **BFR-7**, rendendo 9,0 mg.

5.5.1.3.2 Obtenção do espectro de RMN ^{13}C e o cromatograma da amostra BFRE-2A2

A amostra BFRE-2A2 (60 mg) foi submetida à análise por RMN ^{13}C e o espectro comprovou que essa amostra era bastante promissora, devido a presença de mistura de saponinas. Essa amostra ainda foi submetida à análise por CLAE através de uma eluição isocrática utilizando uma mistura de solventes (acetonitrila/água 50:50) e com comprimento de onda em 205 nm com fluxo de 2 μL /min. O cromatograma também corroborou com os resultados, mostrando mais uma vez que a amostra encontrava-se impura.

5.5.1.3.3 Fracionamento cromatográfico de BFRE-2A9

0,8 g de BFRE-2A9 foram dissolvidos em metanol e submetidos à cromatografia de adsorção sob média pressão “flash” (Å μm 40-63), em que 75,0 g de sílica foi acondicionada com acetato de etila numa coluna de 27 cm de altura e 3 cm de diâmetro. A eluição foi feita de modo gradiente e os solventes utilizados foram AcOEt, MeOH e água. Este procedimento rendeu 23 frações e os dados deste procedimento estão mostrados na **Tabela 12**. Após serem analisadas em CCD com eluentes variando entre hexano/AcOEt (70:30) e AcOEt /MeOH (50:50) com adição de 5 gotas de ácido acético, as frações foram reunidas segundo mostra a **Tabela 13**.

Tabela 12 – Dados referentes à eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-2A9

Frações	Eluente da coluna	Volume (mL)
1-2	AcOEt/MeOH 20 %	100
3-7	AcOEt/MeOH 30 %	250
8-9	AcOEt/MeOH 40 %	100
10-11	AcOEt/MeOH 50 %	100
12-14	AcOEt/MeOH 60 %	150
15-17	AcOEt/MeOH 80 %	150
18-21	AcOEt/MeOH 90 %	200
22	MeOH 100 %	50
23	MeOH/H ₂ O 50 %	50

Tabela 13 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2A9

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
BFRE-2A9 (1) (1-2)	2,3	BFRE-2A9 (5) (7-8)	37
BFRE-2A9 (2) (3)	4,4	BFRE-2A9 (6) (9-15)	527
BFRE-2A9 (3) (4)	1,8	BFRE-2A9 (7) (16-23)	31,8
BFRE-2A9 (4) (5-6)	13,3		
Total:			617,6
Rendimento:			77,2%

5.5.1.4 Partição do extrato BFRE-2

18,0 g de BFRE-2 foram dissolvidos em uma mistura de 50 mL de água e 20 mL de metanol. A mistura obtida foi submetida à partição utilizando solventes com polaridade

crescente como hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As frações obtidas e o rendimento estão expostos na tabela **Tabela 14**, pag. 56.

Tabela 14 – Dados referentes à partição de BFRE-2

Frações	Solvente	Massa (g)
BFRE-2 HEX	Hexano	1,40
BFRE-2 CHCl ₃	Clorofórmio	1,15
BFRE-2 AcOEt	Acetato de etila	3,00
BFRE-2 n-butanol	N-butanol	11,20
BFRE-2 H ₂ O	Água	0,50
Total:		17,25
Rendimento:		95,83%

5.5.1.4.1 Fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl₃

A fração BFRE-2 CHCl₃ (1,15 g) foi submetida à cromatografia de adsorção sob pressão média utilizando 37 g de sílica “flash” (altura: 28 cm e diâmetro: 3,0 cm). Foram utilizados hexano, acetato de etila, metanol e água, puros ou em misturas binárias de polaridade crescente como solvente na eluição. As frações obtidas tiveram seus solventes evaporados sob pressão reduzida, resultando nas frações mostradas na **Tabela 15**. Em seguida, após análise por CCD, utilizando como eluente mistura de solventes com polaridade crescente, desde hexano/AcOEt 30 % até AcOEt/MeOH 40 %, as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas de acordo com a **Tabela 16**, pag. 57.

Tabela 15 – Dados referentes à eluição utilizada no fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl₃

Frações	Eluente da coluna	Volume (mL)
1-5	Hex/ AcOEt 20 %	200
6-7	Hex/ AcOEt 35 %	100
8-9	Hex/ AcOEt 50 %	100
10-11	Hex/ AcOEt 75 %	100
12-13	AcOEt/MeOH 10 %	100
14-15	AcOEt/MeOH 30 %	100
16-18	AcOEt/MeOH 50 %	200
19-20	AcOEt/MeOH 80 %	100

21-22	MeOH	100
23-24	MeOH/H ₂ O 50 %	100

Tabela 16 - Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl₃

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
BFRE-2 CHCl ₃ -1 (1-3)	70,4	BFRE-2 CHCl ₃ -4 (17-19)	167,7
BFRE-2 CHCl ₃ -2 (4-9)	51,1	BFRE-2 CHCl ₃ -5 (20-22)	140,3
BFRE-2 CHCl ₃ -3 (10-16)	150,8	BFRE-2 CHCl ₃ -6 (23-24)	173,7
		Total:	754
		Rendimento:	65,6%

5.5.1.4.2 Fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl₃-1

A fração BFRE-2 CHCl₃-1 (70,4 mg) foi dissolvida em 3 mL de uma mistura de solventes (CNCH₃/H₂O 50 %), filtrada e submetida a análise por CLAE, utilizando coluna semi-preparativa RP-18 (10 x 250 mm, 10 µm) e operando de modo reverso, mantidas num forno termostático à 35°C. A análise preliminar sugeriu um método com resolução para separação cromatográfica, utilizando eluição isocrática com uma mistura de solventes CNCH₃/H₂O (50:50) com fluxo de 3mL/min, injetando-se 20 µL de amostra. Este método foi reproduzido em loop de 100 µL para realizar a coleta das amostras.

O cromatograma da fração em 370 nm mostrou seis picos, sendo três deles com absorção mais intensa, com tempo de retenção de 7,2 min (pico 1), 8,8 min (pico 2) e 9,6 min (pico 3) que foram coletados separadamente, além de serem coletados também os picos de menor absorção. Todas as frações com absorção mais intensa foram analisadas por RMN ¹H e ¹³C. A fração correspondente ao pico 1 revelou ser uma xantona, denominada **BFR-5** (10,5 mg), a fração correspondente ao pico 2 apresentou-se como uma mistura (17,0 mg) e a fração correspondente ao pico 3 tratava-se de uma xantona já isolada anteriormente, denominada **BFR-3** (13,0 mg). As frações correspondentes aos picos com baixa absorção não obtiveram massa suficiente para serem analisadas.

5.5.1.4.3 Fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl₃-4

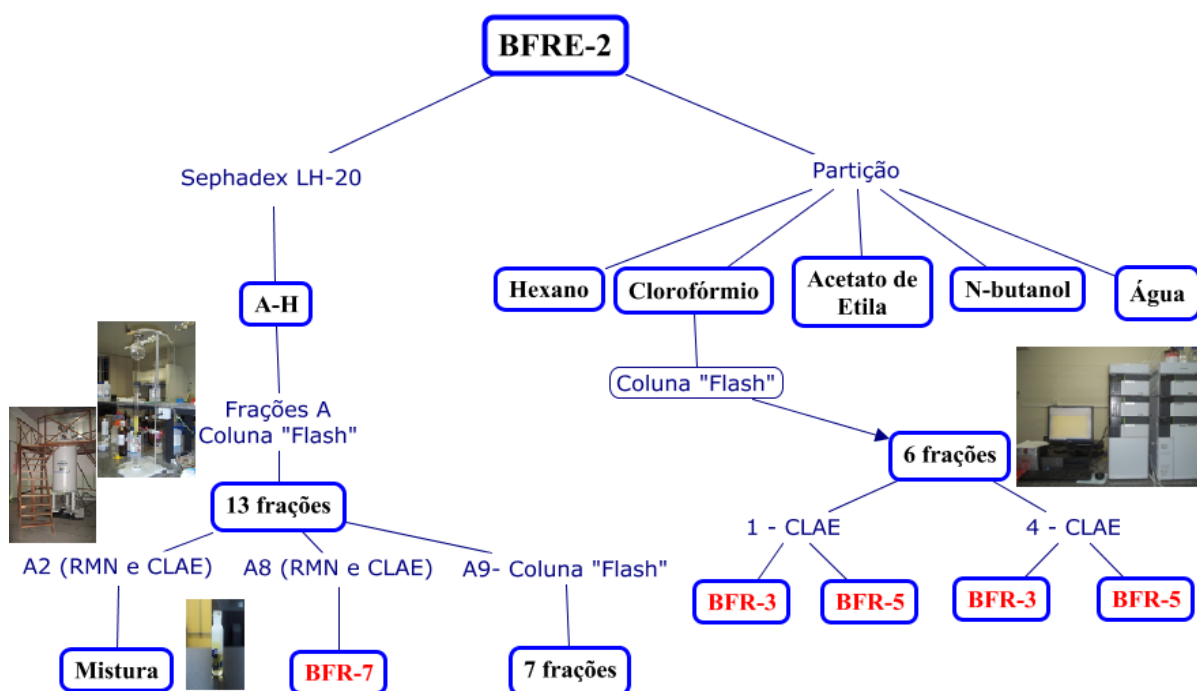
167,7 mg da fração BFRE-2 CHCl₃-4 foi dissolvida em 7 mL de uma mistura de solventes (CNCH₃/H₂O 50 %), filtrada e submetida a análise por CLAE, utilizando coluna

semi-preparativa RP-18 (10 x 250 mm, 10 μ m) e operando de modo reverso, mantidas em um forno termostático à 35°C. A análise preliminar sugeriu um método com resolução para separação cromatográfica, utilizando eluição isocrática com uma mistura de solventes $\text{CNCH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (45:55) com fluxo de 3mL/min, injetando-se 20 μ L de amostra. Este método foi reproduzido em loop de 100 μ L para realizar a coleta das amostras.

O cromatograma da fração em 370 nm mostrou cinco picos, sendo três deles com absorção mais intensa, com tempo de retenção de 8,5 min (pico 1), 10,9 min (pico 2) e 12,2 min (pico 3) que foram coletados separadamente, além de serem coletados também os picos de menor absorção. Todas as frações com absorção mais intensa foram analisadas por RMN ^1H e ^{13}C . A fração correspondente ao pico 1 revelou ser uma xantona, denominada **BFR-4** (4,8 mg), a fração correspondente ao pico 2 apresentou-se como uma mistura (8,0 mg) e a fração correspondente ao pico 3 tratava-se de uma xantona já isolada anteriormente, denominada **BFR-3** (60,0 mg). As frações correspondentes aos picos com baixa absorção não obtiveram massa suficiente para serem analisadas.

Os procedimentos experimentais relacionados ao extrato BFRE-2 estão descritos no **Fluxograma 3**.

Fluxograma 3 – Isolamento de BFR-3, BFR-5 e BFR-7 a partir do fracionamento cromatográfico de BFRE-2



5.6 TESTES BIOLÓGICOS

Os testes biológicos do extrato das raízes de *Bredemeyera floribunda*, frações e substâncias isoladas foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET) da UFC, pela mestrande Natacha Queiroz e por Rafael Ximenez, sob a orientação da professora Helena Serra Azul Monteiro.

5.6.1 Ensaios *in vivo*

5.6.1.1 Atividade Hemorrágica

a) Grupos experimentais

I. Grupo veneno: animais tratados com 50 µg/animal de veneno de *Bothrops jararacussu* (vBju) dissolvidos em 50µL de solução de NaCl 0,9%.

II - Grupo pré-tratado i.p.: animais tratados com o extrato de *B. floribunda* (BFRE; 150mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do veneno (50 µg/animal).

III – Grupo pré-tratado v.o.: animais tratados com o extrato de *B. floribunda* (BFRE; 150mg/kg, v.o.) 30 minutos antes da administração do veneno (50 µg/animal).

IV- Grupo pós-tratado i.p.: animais tratados com BFRE (150mg/kg, i.p.) 30 minutos após a administração do vBju (50 µg/animal).

V - Grupo pós-tratado v.o.: animais tratados com BFRE (150mg/kg, v.o.) 30 minutos após a administração do vBju (50 µg/animal).

VI - Grupo pré-incubado: animais tratados com BFRE (150mg/kg) e vBju (50 µg/animal), (1:3, p/p) pré-incubados por 15 minutos a temperatura de 37° C.

VII - Grupo controle com soro antibotrópico (SAB): animais tratados com SAB i.p. (quantidade suficiente para neutralizar 500 µg de veneno) 30 minutos antes da administração do vBju (50 µg/animal).

b) Procedimento Experimental

Camundongos machos Swiss, foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg i.p.) para posteriormente ter o dorso tricotomizado onde foi injetado por via intradérmica 50 µL de uma solução contendo 50 µg de vBju. Os tratamentos foram realizados conforme os grupos

experimentais discriminados anteriormente. Decorridas 2 horas para cada grupo, os animais foram sacrificados e a pele do dorso foi removida. A superfície interna da pele foi examinada e fotografada. O tamanho da área hemorrágica foi medido com o programa Image®, um software desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland. A área dos halos é contornada por meio de ferramentas do programa e o resultado é transformado de pixels para mm². O tecido do dorso foi coletado para análise histológica (ESMERALDINO et al., 2005).

5.6.2 Ensaio *in vitro*

5.6.2.1 Atividade Proteolítica

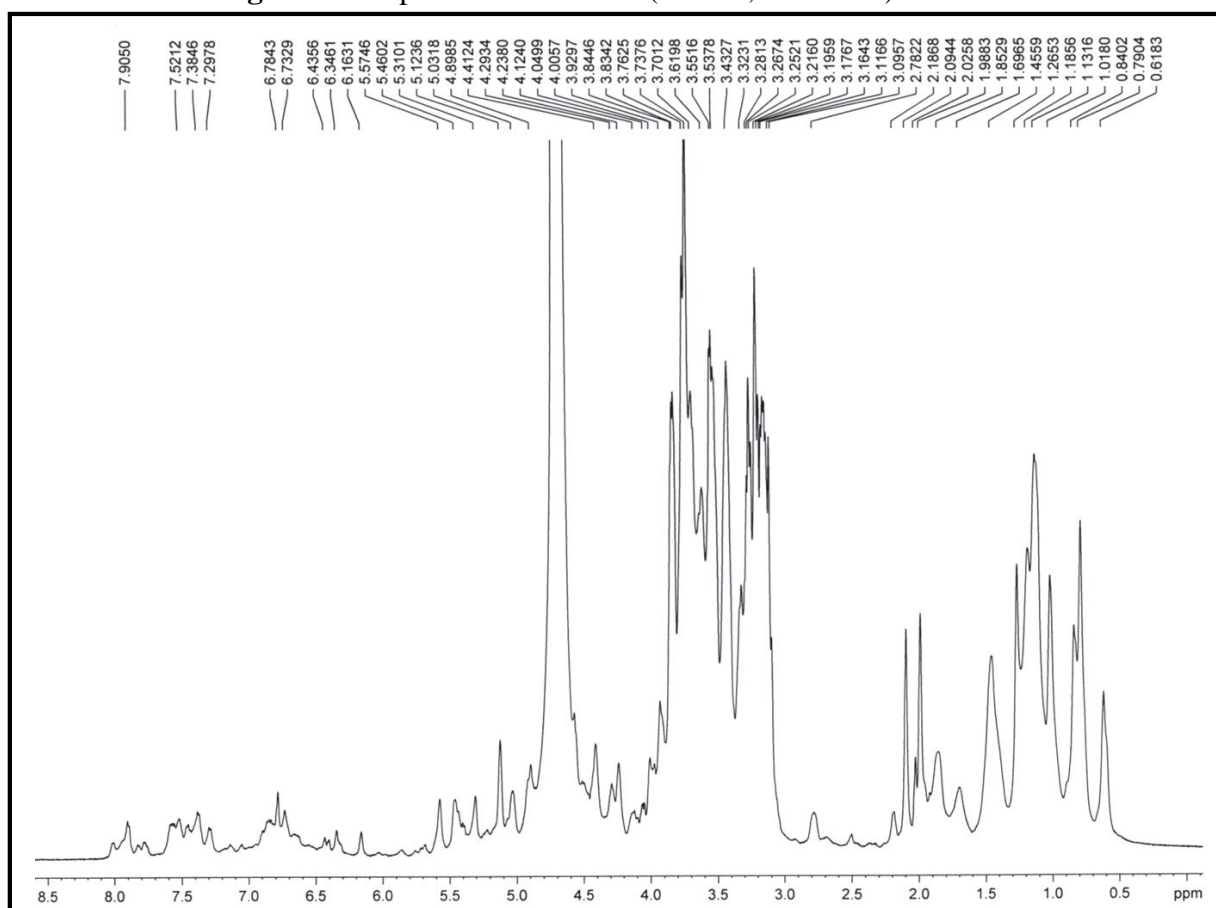
A mensuração do efeito das frações e das substâncias isoladas de *B. floribunda* frente à atividade proteolítica induzida pelo veneno de *B. jararacussu* foi determinada utilizando-se o substrato cromogênico sintético azocaseína, segundo o método de Erlanger e colaboradores (1961) modificado para leitura de microplacas de 96 poços (PONCE-SOTO et al., 2007). A mistura reacional será preparada utilizando 20 µL de substrato (azocaseína), 200 µL de tampão (Tris-HCl, 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.8), 20 µL de SBf (1 mg/mL), dissolvida em solução de PBS-DMSO 10%) e 20 µL do vBju, com um volume final de 260 µL. Também foram realizados ensaios nas razões de 1:2 e 1:3 (VBju:SBf, massa/massa). Dois brancos foram realizados, o branco geral (no qual todos os componentes da mistura reacional foram adicionados, exceto o VBju e as substâncias de *B. floribunda*) e o branco das frações e das substâncias isoladas (no qual somente o veneno não fez parte da mistura reacional). Após 30 minutos, a reação foi bloqueada com ácido acético 30% (50 µL) e lida a um comprimento de onda 410 nm em leitor de placas VERSA Max microplatereader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os resultados foram expressos em nmol/mL/min.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE PRELIMINAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *B. floribunda* (BFRE)

O extrato etanólico de *B. floribunda* foi submetido à análise por RMN e seu espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD, **Figura 9**) apresentou absorções características de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos compreendidos entre δ 0,5 e 3,0, bastante representativos de agliconas de saponinas. Além disso, entre δ 3,0 e 5,6 encontram-se absorções relacionadas a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, principalmente encontrados em carboidratos. E na região compreendida entre δ 6,0 e 8,0 observam-se sinais de absorções de compostos fenólicos, como xantonas e flavonóides.

Figura 9 – Espectro de RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) de BFRE



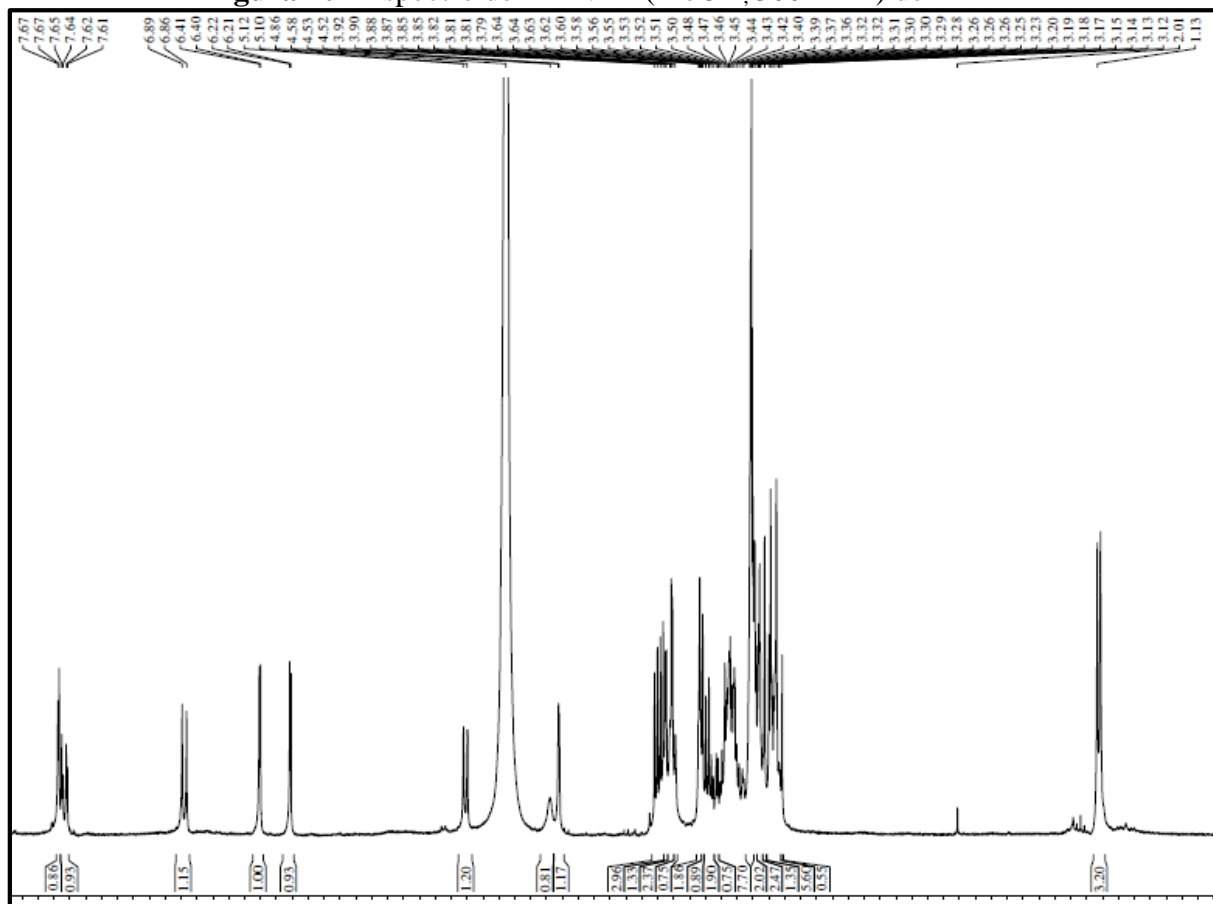
6.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS DE *Bredemeyera floribunda* Willd

6.2.1 BFR-1

Do tratamento cromatográfico inicial do extrato etanólico da raiz de *B. floribunda* obteve-se 1,3 g de uma substância denominada BFR-1, solúvel em metanol.

O espectro de RMN ^1H (MeOD, 300 MHz, **Figura 10**) apresentou absorções características de hidrogênios de carboidratos entre δ 3,0 e 4,5. E ainda, absorções bem características de hidrogênios ligados a anel aromático com deslocamento entre δ 6,21 e 7,67.

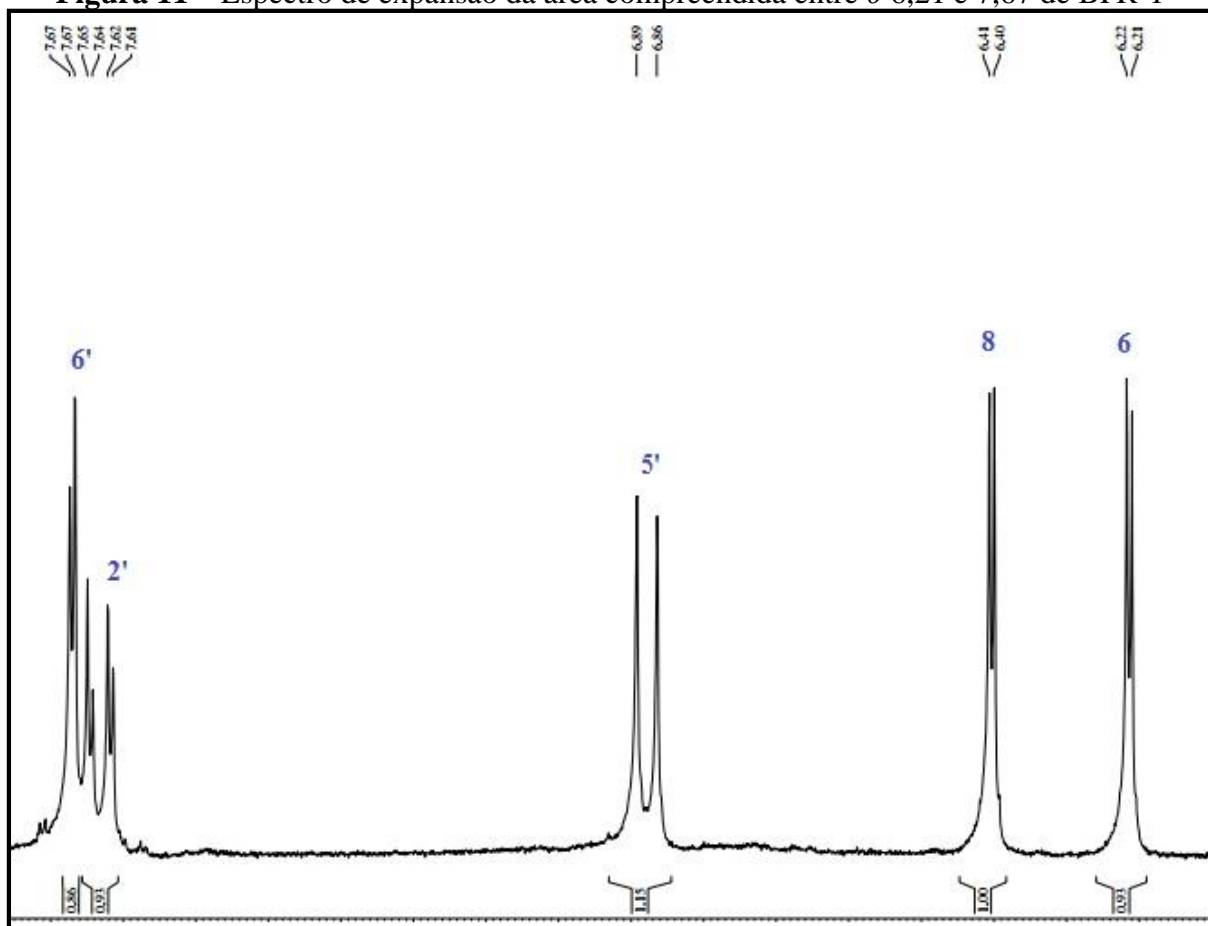
Figura 10 - Espectro de RMN ^1H (MeOD, 300 MHz) de BFR-1



A ampliação da área compreendida entre δ 6,21 e 7,67 (**Figura 11**) possibilitou a distinção dos acoplamentos existentes para os hidrogênios com deslocamento em δ 6,22 (H_6 , d, $J = 3,0$ Hz) e δ 6,41 (H_8 , d, $J = 3,0$ Hz), característicos de hidrogênios posicionados em meta, e que estão sob efeito de grupos protetores. Foi possível evidenciar os acoplamentos dos hidrogênios centrados em δ 6,89 (H_5 , d, $J = 9,0$ Hz) e δ 7,63 (H_6 , dd, $J = 7,5$ Hz e $3,0$ Hz) orto posicionados, e localizados em um anel aromático diferente dos outros dois hidrogênios anteriores. E deste último com o hidrogênio em δ 7,67 (H_2 , d, $J = 3,0$ Hz), em uma correlação

de posicionamento meta. Todas essas correlações são bastante conhecidas na literatura e bem características do flavonóide Rutina.

Figura 11 – Espectro de expansão da área compreendida entre δ 6,21 e 7,67 de BFR-1



O espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, **Figura 12**) mostrou vinte e sete linhas espectrais, das quais um sinal em δ 18,5, característico de carbono metílico. Ficou evidente a presença de carbonos do tipo sp^3 oxigenados na faixa compreendida entre δ 68,5 e 104,8, característicos de carboidratos, além de duas absorções características de carbonos anoméricos em δ 102,5 ($\text{C-1}'''$) e 104,8 ($\text{C-1}''$). Da região compreendida entre δ 105,1 até 166,1, observaram-se absorções características de carbonos sp^2 pertencentes a anéis aromáticos. O espectro também mostrou uma absorção atribuída a carbonila de cetona em δ 178,6 (C-4).

Todas essas atribuições são compatíveis com as absorções do flavonóide Rutina (**Figura 13**) descritos na literatura (MOURA et al., 2011). Porém, para uma atribuição inequívoca da molécula, os dados de RMN ^1H e ^{13}C foram comparados aos dados da literatura e dispostos na **Tabela 17**.

Figura 12 - Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz) de BFR-1

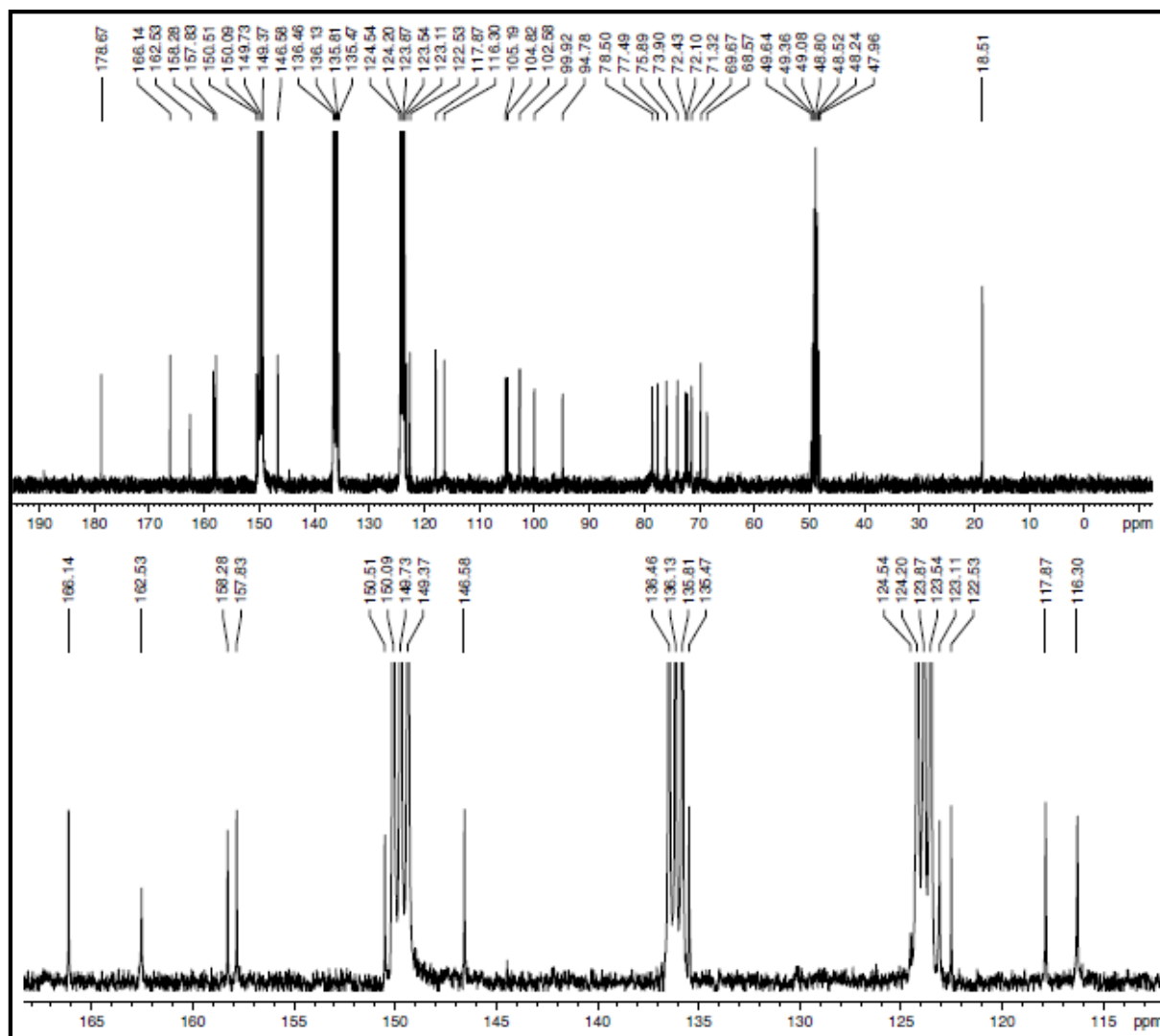


Figura 13 – Estrutura do flavonóide Rutina (BFR-1)

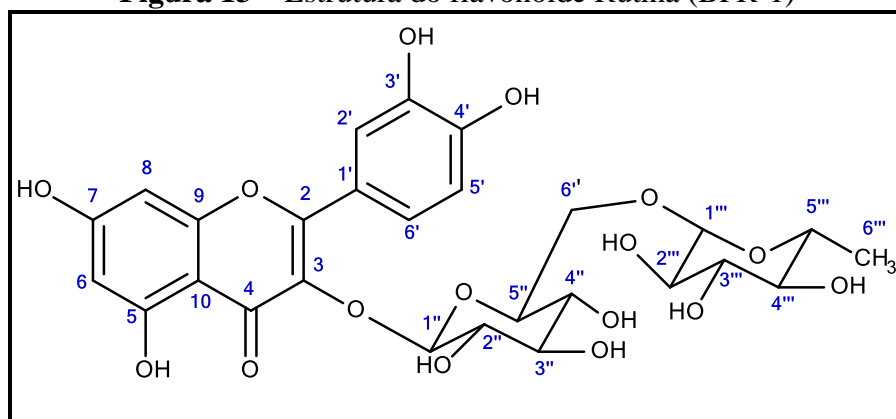


Tabela 17 - Dados de RMN ^1H (MeOD, 300 MHz) e ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz) de BFR-1 e comparação com dados da literatura de MOURA et al., 2011.

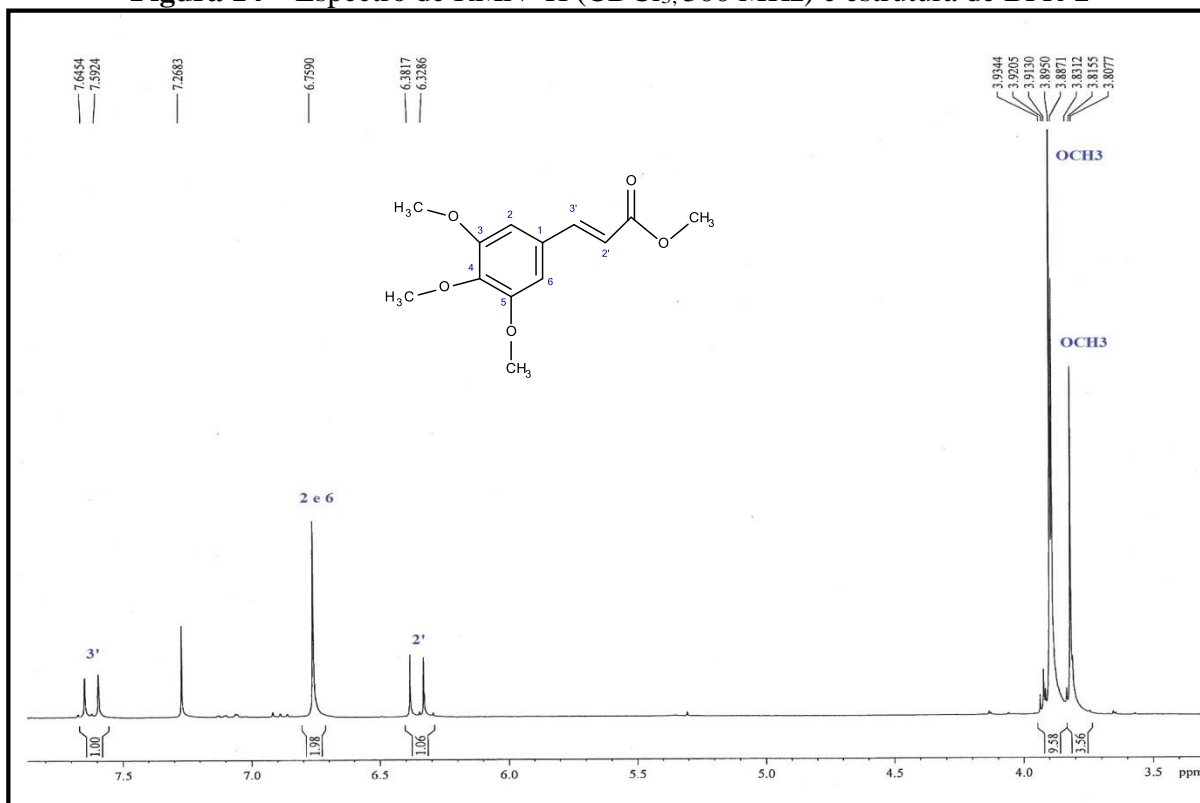
C	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C MOURA et al., 2011	RMN ^1H (int.,mult., $J_{\text{H,H}}$)	RMN ^1H (int.,mult., $J_{\text{H,H}}$) MOURA et al., 2011
2	158,2	156,5		
3	146,5	133,2		
4	178,6	177,3		
5	162,5	161,2		
6	99,9	98,7	6,22 (1 H, d, 3,0 Hz)	6,20 (1 H, d, 2,1 Hz)
7	166,1	164,5		
8	94,7	93,6	6,41 (1 H, d, 3,0 Hz)	6,40 (1 H, d, 2,1 Hz)
9	157,8	156,4		
10	105,1	103,7		
1'	135,4	121,5		
2'	122,5	116,2	7,65 (1 H, d, 3,0 Hz)	7,53 (1 H, d, 2,0 Hz)
3'	117,8	115,2		
4'	150,5	148,5		
5'	116,3	115,2	6,89 (1 H, d, 9,0 Hz)	6,83 (1 H, d, 9,0 Hz)
6'	123,1	121,0	7,67 (1 H, dd, 3,0 Hz e 7,5 Hz)	7,75 (1 H, dd, 2,4 Hz e 7,8 Hz)
1''	104,8	101,2		
2''	77,4	75,8		
3''	75,8	74,0		
4''	71,3	69,9		
5''	78,5	76,4		
6''	68,5	66,9		
1'''	102,5	100,7		
2'''	72,4	70,5		
3'''	72,1	70,3		
4'''	73,9	71,8		
5'''	69,6	68,2		
6'''	18,5	17,6		

* Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em ppm. Os dados da referência foram obtidos sob as seguintes condições: RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) e ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz).

6.2.2 BFR-2

Dos tratamentos cromatográficos do extrato etanólico da raiz de *B. floribunda* obteve-se 13,3 mg de um sólido branco, com ponto de fusão 90 °C, solúvel em clorofórmio, denominado BFR-2.

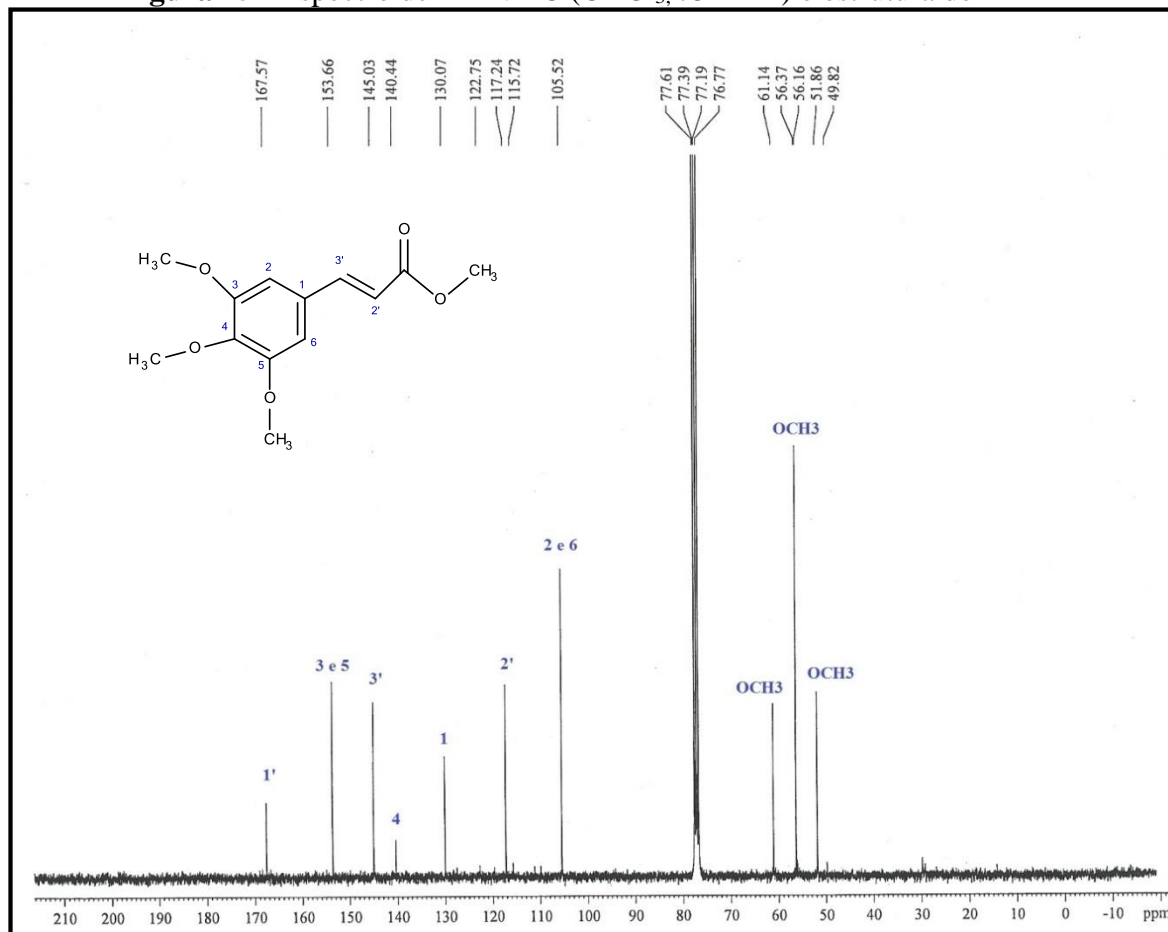
O espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , **Figura 14**) apresentou absorções características de hidrogênios olefínicos, com estereoquímica *trans* em δ 6,3 (H_2 , d, $J = 15,9$ Hz) e δ 7,5 (H_3 , d, $J = 15,9$ Hz).

Figura 14 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e estrutura de BFR-2

O espectro ainda mostrou um singlete integrado para dois hidrogênios em δ 6,7 ($2\text{H}_{2,6}$, s) característico de hidrogênios aromáticos blindados e equivalentes. E apresentou ainda, absorções para quatro grupos metóxi, sendo um singlete em δ 3,9 integrado para nove hidrogênios e um singlete em δ 3,8 integrado para três hidrogênios. Os dados espectrais de RMN ^1H foram determinantes para sugerir a estrutura do composto BFR-2.

O espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , **Figura 15**) mostrou oito linhas espectrais em região característica de carbonos sp^2 , dos quais quatro carbonos não hidrogenados em δ 130,07 (C-1), 140,44 (C-4) e uma absorção em δ 153,66 para dois carbonos (C-3 e C-5), posto que a molécula apresenta-se de forma simétrica no anel aromático. Além disso, mostrou quatro carbonos mono hidrogenados em δ 117,24 (C-2'), 145,03 (C-3') e um sinal em δ 105,52 para dois carbonos (C-2 e C-6) em virtude da simetria do anel.

O espectro também mostrou uma absorção atribuída a carbonila de éster em δ 167,57. Bem como, sinais referentes a quatro metoxilas. Um sinal em δ 51,86, associado ao carbono sp^3 oxigenado ligado a carbonila de éster, como ainda outros três sinais característicos de metoxilas ligadas a carbonos aromáticos vicinais. Uma dessas metoxilas mais desblindada em δ 61,14, indicativa de aglomeração estérica em torno de ambos os grupos metoxilas desblindados centrados em δ 56,37 e 56,16 e que estão ligados a anéis aromáticos.

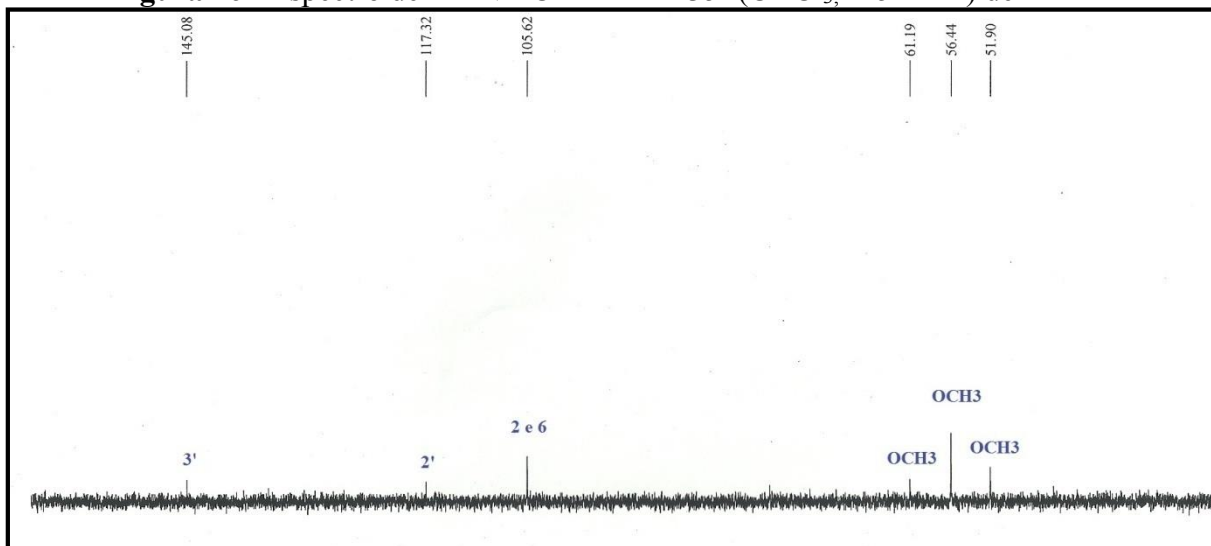
Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) e estrutura de BFR-2

A comparação do espectro de RMN ^{13}C -CPD com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 (**Figura 16**) possibilitou a definição do padrão de hidrogenação relativo a cada átomo de carbono, distinguindo-se os carbonos não hidrogenados dos demais carbonos a partir da subtração espectral.

Assim sendo, constatou-se a presença de cinco carbonos não hidrogenados (C), quatro carbonos mono hidrogenados (CH) e quatro carbonos metílicos (OCH_3).

A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1J_{\text{H,C}}$) – HSQC (CDCl_3 , **Figura 17**) mostrou que o carbono com absorção em δ 51,86 correlacionou-se com os hidrogênios em δ 3,8, confirmando o grupamento metoxila. Do mesmo modo, os carbonos com sinais em δ 56,16 e 56,37 correlacionaram-se com os hidrogênios em δ 3,9, evidenciando o mesmo tipo de grupamento. O quarto grupo metoxila foi confirmado pela correlação do carbono em δ 61,14 com os hidrogênios restantes em δ 3,9. Além disso, a continuação da análise desse espectro também demonstrou as correlações dos carbonos em δ 105,52, 117,24 e 145,03 com os hidrogênios com absorções em δ 6,7 (2H), 6,3 e 7,5, respectivamente.

Figura 16 - Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° (CDCl_3 , 125 MHz) de BFR-2



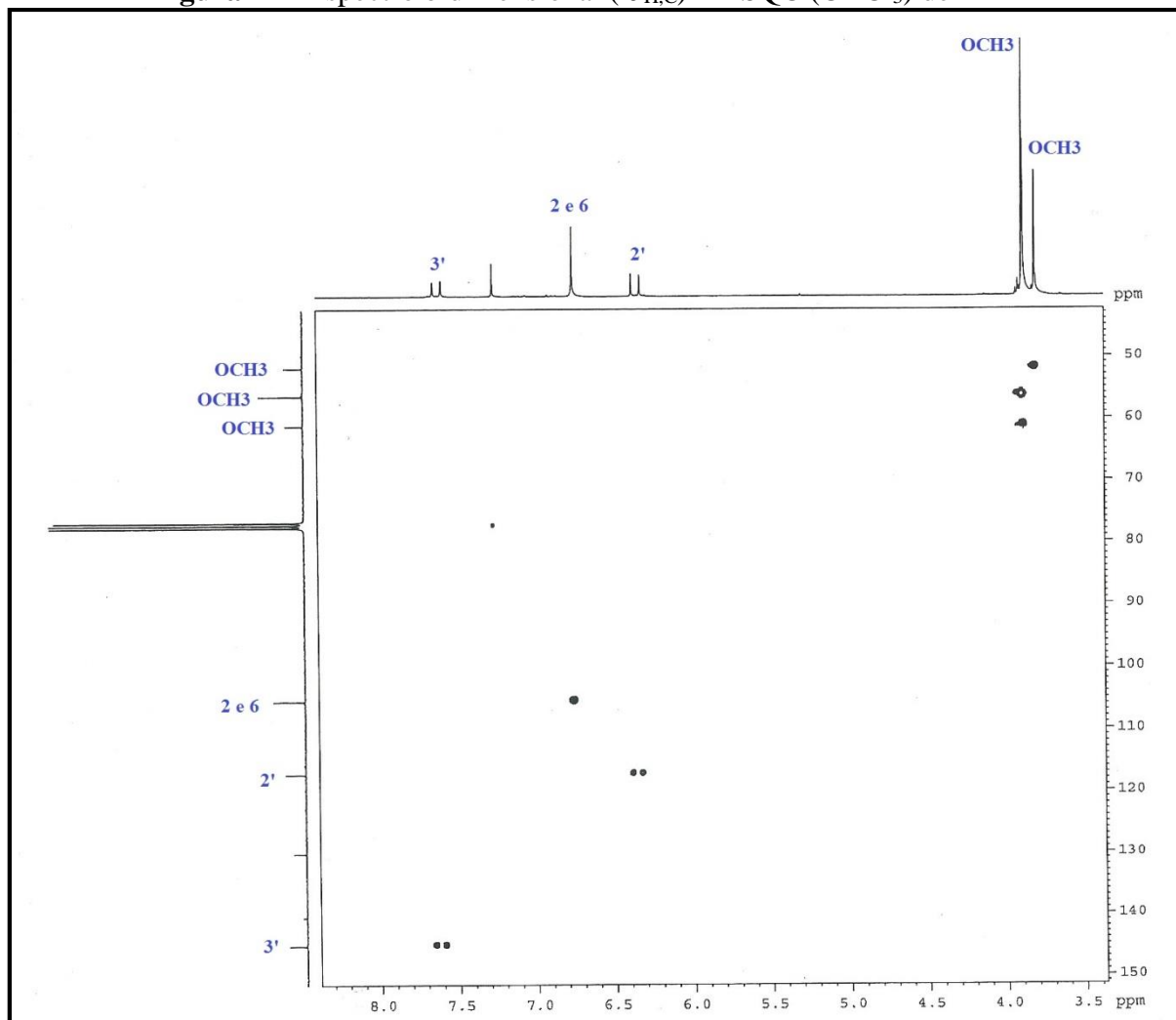
O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear – HMBC (CDCl_3 , **Figura 18**) revelou correlação a três ligações ($^3J_{\text{H,C}}$) entre os hidrogênios com absorção em δ 3,8 e o carbono carbonílico em δ 157,67, assim como a correlação a três ligações ($^3J_{\text{H,C}}$) entre o hidrogênio com sinal em δ 7,5 com esse mesmo carbono. O sinal de hidrogênio em δ 7,5 também mostrou correlação a três ligações ($^3J_{\text{H,C}}$) com os carbonos em δ 105,52, contribuindo para a confirmação de sua simetria. O hidrogênio com absorção em δ 6,3 correlacionou-se a três ligações ($^3J_{\text{H,C}}$) com o carbono em δ 130,07.

Continuando a análise desse espectro, observou-se a correlação ($^3J_{\text{H,C}}$) dos hidrogênios equivalentes do anel aromático com deslocamento em δ 6,7 com os carbonos em δ 105,52, ou seja, o hidrogênio 2 correlaciona-se com o carbono 6 e do mesmo modo, o hidrogênio 6 correlaciona-se com o carbono 2. Além disso, esses hidrogênios correlacionam-se a duas ligações ($^2J_{\text{H,C}}$) com o carbono em δ 130,07 e a três ligações ($^3J_{\text{H,C}}$) com o carbono em δ 140,44. Também, correlacionam-se com o carbono sp^2 em δ 145,03 a três ligações ($^3J_{\text{H,C}}$). O hidrogênio 2 com δ 6,7 correlaciona-se com o carbono em δ 153,66 (C-3), tal como o hidrogênio 6 com mesmo deslocamento correlaciona-se com o carbono em δ 153,66 (C-5), ambos a duas ligações ($^2J_{\text{H,C}}$). Todas essas correlações foram fundamentais para que se chegasse a uma estrutura inequívoca da molécula.

Para a total caracterização estrutural dessa molécula, restaram apenas as correlações dos grupos metoxilas do anel aromático que também foram obtidas através do espectro HMBC. Os hidrogênios com deslocamento em δ 3,9 das metoxilas ligadas aos carbonos em δ 153,66 (C-3 e C-5) correlacionaram-se com o carbono em δ 140,44 a três ligações ($^3J_{\text{H,C}}$). De maneira

análoga, os hidrogênios em δ 3,9 da metoxila ligada ao carbono em δ 140,44 correlacionaram-se com os carbonos em δ 153,66 (C-3 e C-5), também a três ligações ($^3J_{H,C}$).

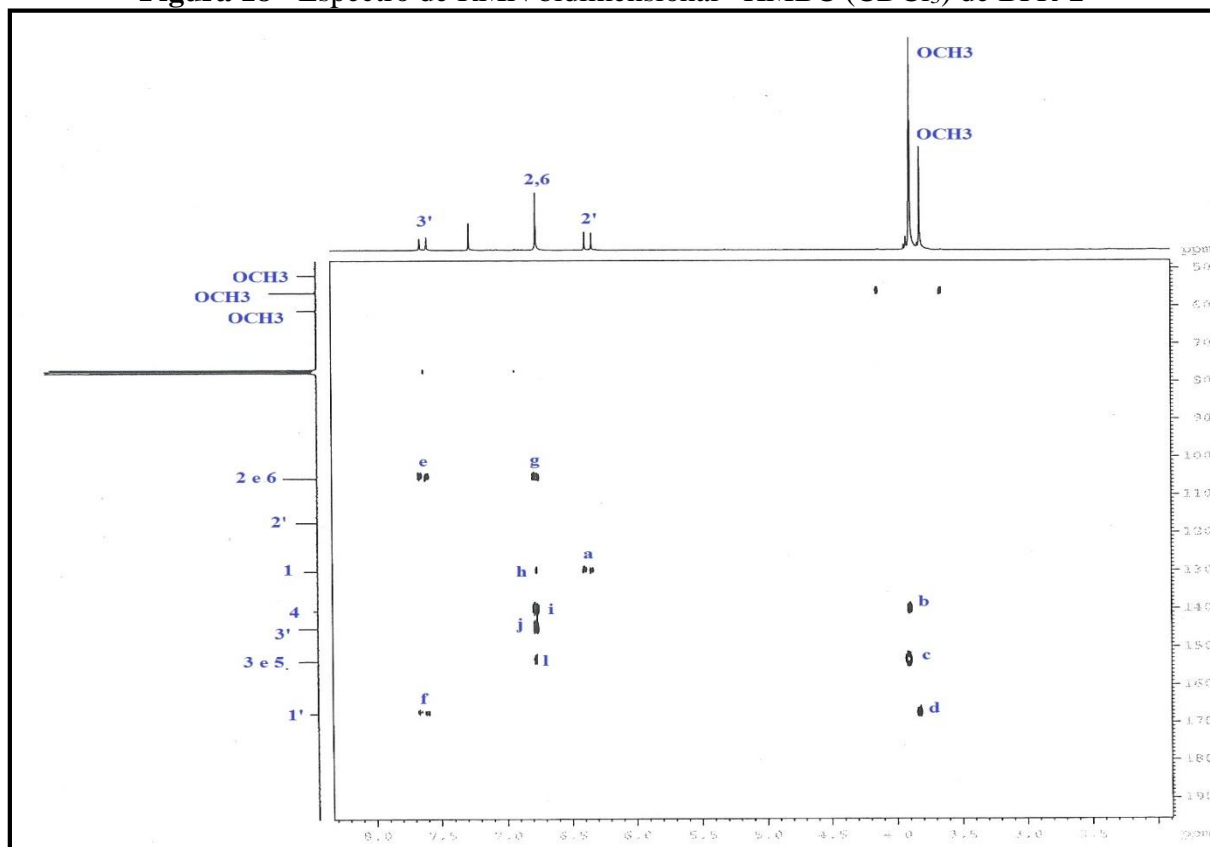
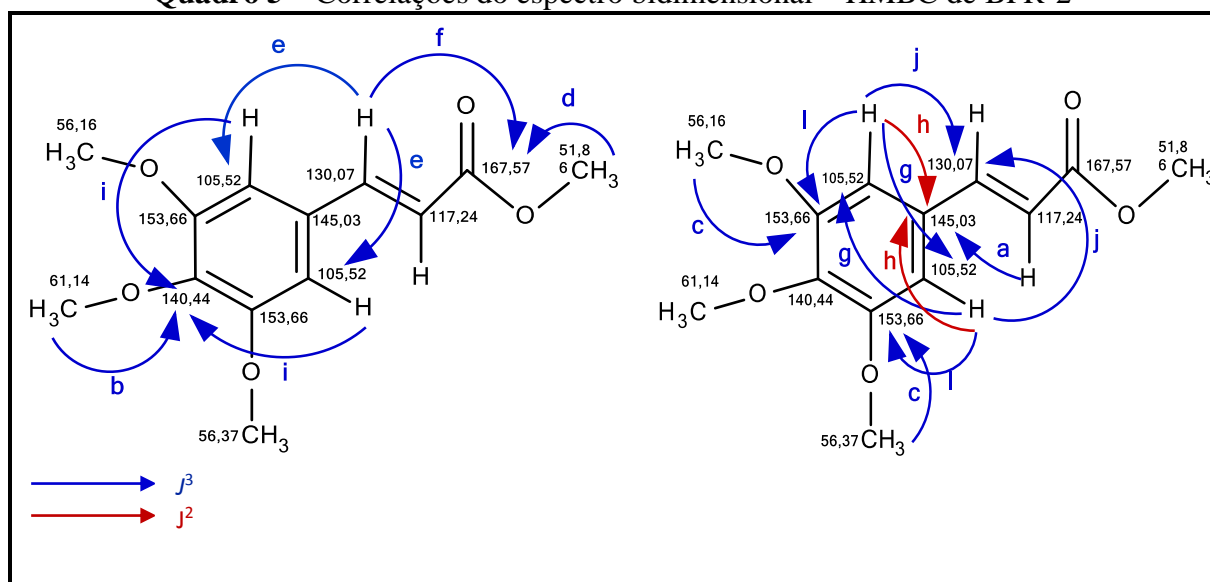
Figura 17 - Espectro bidimensional ($^1J_{H,C}$) – HSQC (CDCl₃) de BFR-2



Todas as correlações obtidas a partir do espectro de correlação heteronuclear - HMBC discutidas até aqui se encontram no **Quadro 5**.

Tanto os dados de RMN 1H e ^{13}C como as correlações obtidas a partir do espectro HSQC, bem como os dados descritos na literatura (RAO et al., 2012) para BFR-1 encontram-se discriminados na **Tabela 18**.

Baseado nos dados espectrais apresentados e na comparação com os dados descritos na literatura foi possível concluir que BFR-1 tratava-se de (2E)-3'-(3,4,5-trimetóxilifenil)-prop-2-enoato de metila (**Figura 19**), um derivado cinâmico relatado de forma inédita para esse gênero.

Figura 18 - Espectro de RMN bidimensional- HMBC (CDCl_3) de BFR-2**Quadro 5** – Correlações do espectro bidimensional – HMBC de BFR-2

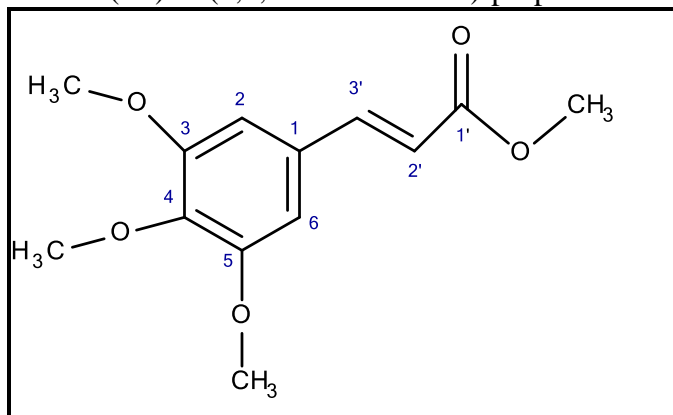
Fonte: próprio autor, 2015

Tabela 18 – Dados de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) de BFR-2 dispostos segundo correlações obtidas através de HSQC e comparação com dados de RMN ^{13}C da literatura de RAO et al., 2012.

C	RMN ^{13}C	RMN ^1H - HSQC (int.,mult., $J_{\text{H,H}}$)	RAO et al., 2012 RMN ^{13}C
1'	167,6		167,0
2'	117,2	6,3 (1H, d, 15,9 Hz)	116,9
3'	145,0	7,6 (1H, d, 15,9 Hz)	144,9
1	130,1		129,0
2	105,5	6,7 (1H, s)	105,6
3	153,7		153,8
4	140,4		140,4
5	153,7		153,8
6	105,5	6,7 (1H, s)	105,6
OCH ₃	61,1	3,9 (3H, s)	60,6
OCH ₃	56,4	3,9 (3H, s)	56,4
OCH ₃	56,2	3,9 (3H, s)	56,4
OCH ₃	51,9	3,8 (3H, s)	51,7

* Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em ppm. Os dados da referência foram obtidos sob as mesmas condições que os dados experimentais contidos nessa tabela.

Figura 19 – Estrutura do (2E)-3'-(3,4,5-trimetóxi)fenil)-prop-2-enoato de metila (BFR-2)



Fonte: próprio autor, 2015

Esse composto já havia sido isolado anteriormente da *Aragoa lucidula* Blake da família Plantaginaceae em 1975 e de outras espécies de peperomias da família Piperaceae em 2009 (Salazar, 2009). Dados da literatura mostram a ação de derivados de ácidos cinâmicos contra os efeitos do veneno da *Bothrops jararacussu* e atestam 60% de inibição desses efeitos (Mors et al., 2000).

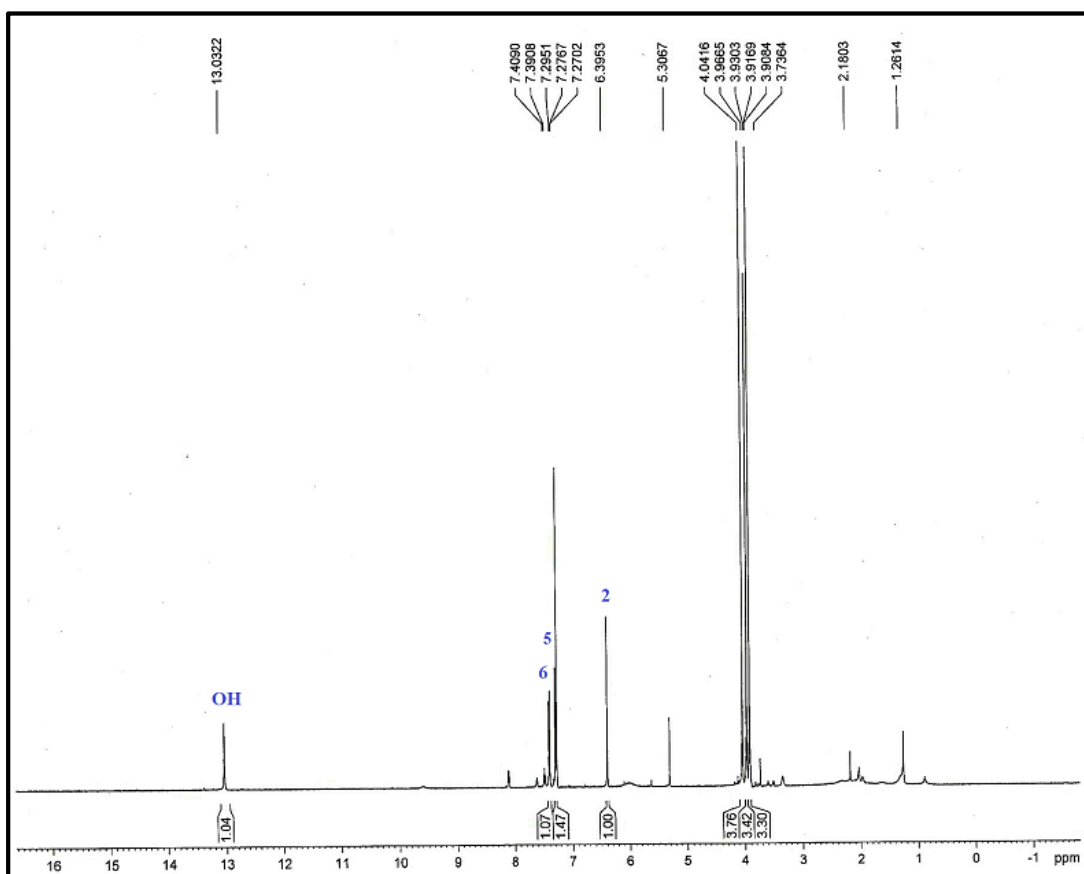
Em uma pesquisa recente, uma série de derivados do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, entre eles, o composto acima citado, foram sintetizados e avaliados quanto aos efeitos antinarcóticos causados pela dependência da morfina em ratos. O estudo comprovou que tais compostos possuem um potencial efeito Antinarcótico (JUNG et al., 2013).

6.2.3 BFR-3

Os mesmos tratamentos cromatográficos utilizados na obtenção de BFR-3 a partir do extrato etanólico da raiz de *B. floribunda* também levaram ao isolamento de um composto denominado BFR-3. Obteve-se 7,5 mg de um sólido amarelo cristalino, com ponto de fusão 187-188 °C e solúvel em clorofórmio. Tratamentos cromatográficos posteriores realizados com a fração clorofórmica proveniente da partição do extrato etanólico das raízes de *B. floribunda* levaram ao isolamento de 73,0 mg de BFRE-3.

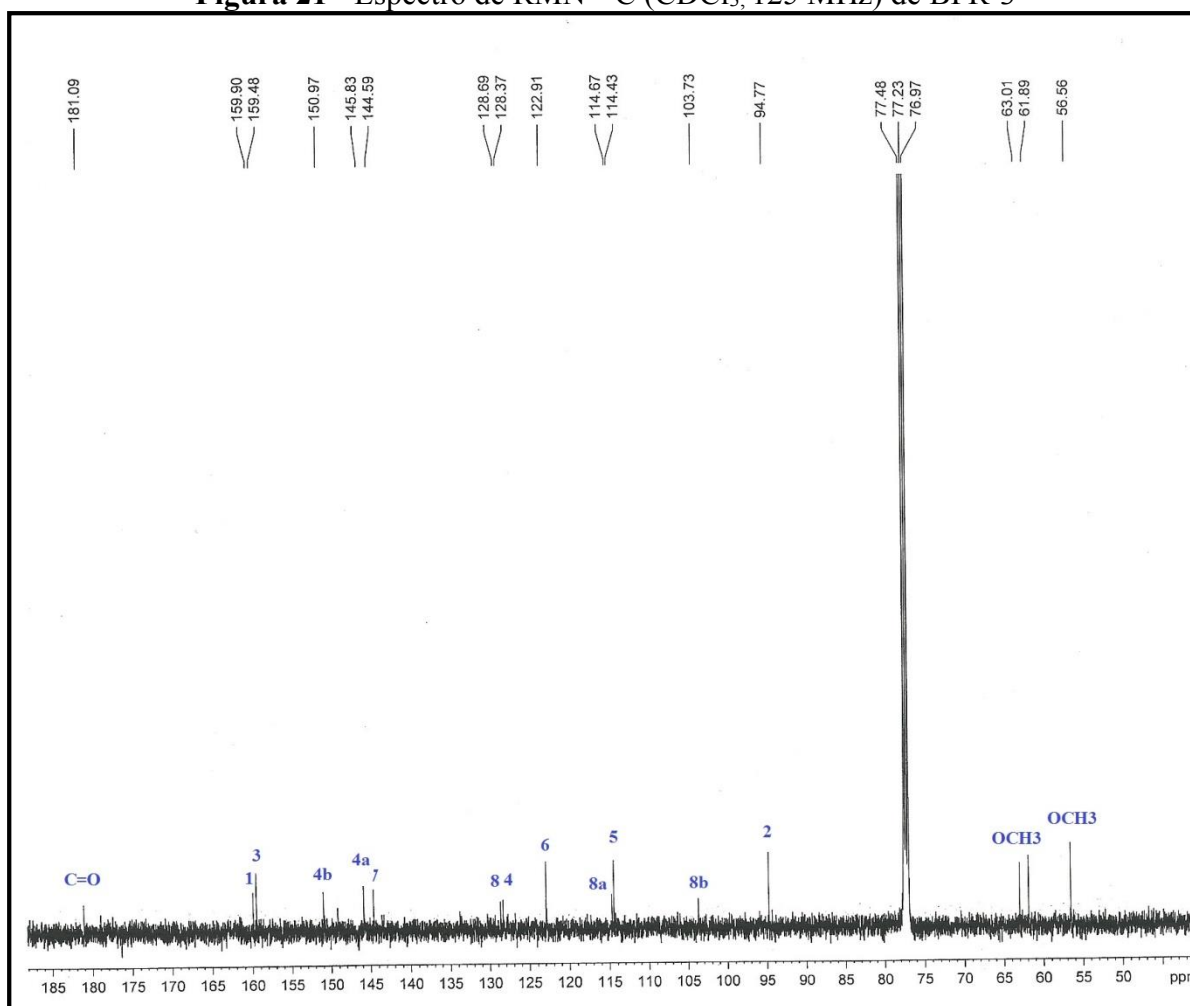
O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , **Figura 20**) mostrou um hidrogênio permutável com D_2O na região de campo baixo (δ 13,03), sugerindo a presença de uma hidroxila quelada com um grupamento carbonila. Além disso, mostrou dois pares de dubletos centrados em δ 7,39 (1 H, $J = 9,0$ Hz) e δ 7,27 (1 H, $J = 9,0$ Hz), orto posicionados. E ainda apresentou um singleto em δ 6,39, referente a um hidrogênio ligado a anel aromático blindado. Do mesmo modo, evidenciou absorções para três grupos metoxi com deslocamentos em δ 3,91, 3,96 e 4,04, incluindo ainda o sinal em δ 5,30, referente aos hidrogênios das duas hidroxilas presentes no composto também permutáveis com D_2O .

Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de BFR-3



O espectro de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , **Figura 21**) mostrou treze carbonos sp^2 , sendo três carbonos hidrogenados em δ 94,7, 114,4 e 122,9 e nove carbonos não hidrogenados com absorções em δ 103,7, 114,6, 128,3, 128,6, 144,5, 145,8, 150,9, 159,4 e 159,9, como também uma absorção característica de carbonila de cetona em δ 181,0. Do mesmo modo, indicou a presença de três grupos metoxi. As absorções dos grupos metoxi foram muito informativas, já que o espectro mostrou duas absorções em δ 61,8 e δ 63,0, indicativo de impedimento estérico em torno de ambos os grupos. Do mesmo modo, mostrou um sinal para um grupo metóxi ligado a anel aromático desimpedido em δ 56,5.

Figura 21 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de BFR-3



Através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ($^1J_{\text{H,C}}$) – HSQC (**Figura 22**) foi possível correlacionar os hidrogênios pertencentes a cada anel aromático aos seus respectivos carbonos. Deste modo, o espectro mostrou que os hidrogênios com deslocamento em δ 3,91 correlacionaram-se com o carbono em δ 56,5, os hidrogênios com absorção em 3,96 correlacionaram-se com o carbono em δ 60,9 e que os hidrogênios com sinal

em δ 4,04 correlacionaram-se com o carbono em δ 63,0.

Ainda foi possível correlacionar o hidrogênio centrado em δ 6,39 com o carbono em δ 94,7, o hidrogênio em δ 7,28 com o carbono em δ 114,4. Por fim, o espectro ainda assinalou a correlação existente entre o hidrogênio com absorção em δ 7,39 com o carbono em δ 122,9.

Os valores obtidos foram comparados com valores relatados na literatura (SILVEIRA et al., 1995) e dispostos na **Tabela 19**, o que possibilitou a confirmação da estrutura da molécula deste composto como sendo o 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona (**Figura 23**).

Figura 22 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1J_{H,C}$) – HSQC ($CDCl_3$) de BFR-3

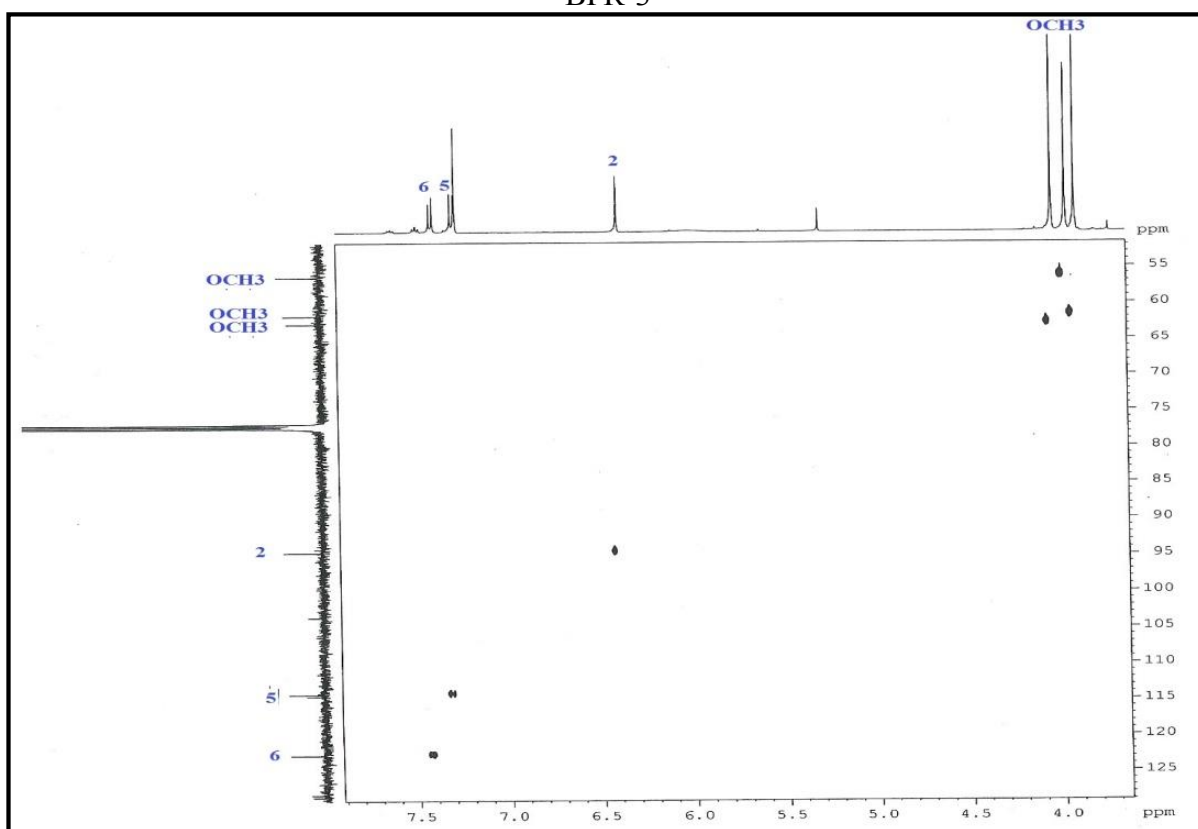
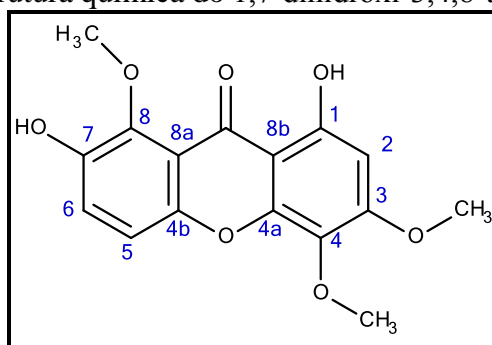


Figura 23 -Estrutura química do 1,7-dihidroxi-3,4,8-trimetoxixantona



Fonte: próprio autor, 2015

O composto descrito já havia sido isolado anteriormente da própria *B. floribunda Willd* e mostrou ser um princípio ativo da *P. tenuifolia*, causando redução da aldose, útil no tratamento de complicações da diabetes (Silveira et al., 1995).

Estudos realizados com substâncias isoladas de plantas do Nordeste do país, entre elas, essa mesma xantona, analisaram a ação antiproliferativa *in vitro* utilizando três linhas de células humanas: leucemia, tumor do pulmão e fibroblastos normais da pele. Os resultados demonstraram que esta substância possui baixa atividade relativa (PESSOA et al., 2000).

Zheng e colaboradores examinaram recentemente a ação hepatoprotetora contra o tetracloreto de carbono (CCl₄) de duas xantonas isoladas de *Swertia punicea*. A xantona 1,7-dihidróxi-3,4,8-trimetóxi-xantona exibiu atividade *in vitro* e *in vivo* (Zheng et al., 2014).

Tabela 19 - Dados de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) e ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) da substância BFR-3 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC em comparação com os dados da literatura.

C	δ C	δ C*	δ H (mult., int., J/Hz)	δ H (mult., int., J/Hz)*
1	159,9	159,3		
2	94,7	94,6	6,39 (s, 1 H)	6,39 (s, 1 H)
3	159,4	158,4		
4	128,3	127,5		
4a	145,8	148,3		
4b	150,9	149,4		
5	114,4	113,4	7,28 (d, 1 H, J = 9,0)	7,25 (d, 1 H, J = 9,0)
6	122,9	124,6	7,39 (d, 1 H, J = 9,0)	7,36 (d, 1 H, J = 9,0)
7	144,5	147,0		
8	128,6	145,4		
8a	114,6	114,6		
8b	103,7	102,2		
C=O	181,0	180,8		
OMe	63,0	61,0	4,04 (s, 3 H)	4,00 (s, 3 H)
OMe	61,8	60,9	3,91 (s, 3 H)	3,88 (s, 3 H)
OMe	56,5	56,4	3,96 (s, 3 H)	3,94 (s, 3 H)

* Os dados de RMN ¹H foram obtidos em 200 MHz, DMSO-d₆ e os de RMN ¹³C em 100 MHz, DMSO-d₆ (SILVEIRA et al., 1995).

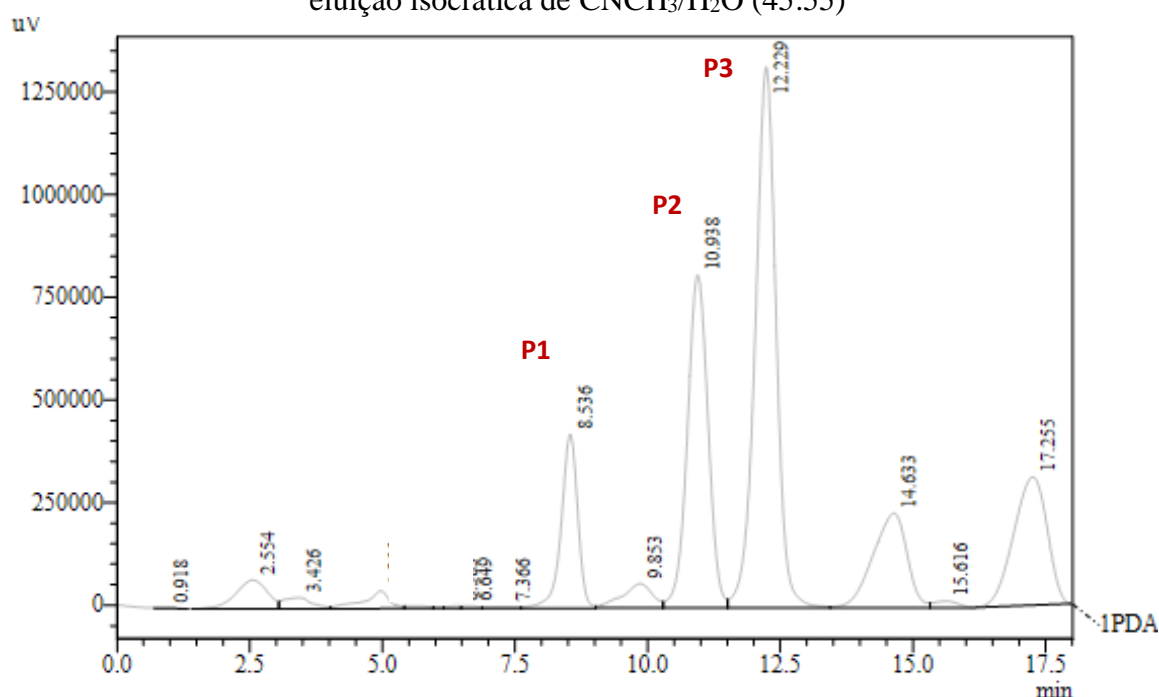
6.2.4 BFRE-4

BFRE-4 foi obtida a partir do fracionamento cromatográfico em sílica flash e purificação por CLAE da fração clorofórmica proveniente da partição do extrato etanólico das raízes de *B. floribunda*. Foram obtidos 18,1 mg de BFRE-3 na forma de um sólido amarelo claro cristalino e solúvel em clorofórmio.

O tratamento da fração BFRE-2 CHCl_3 -4 por CLAE levou ao isolamento de duas substâncias. No cromatograma obtido (**Figura 24**) foi possível identificar a primeira substância (BFR-4) como sendo o pico 1, com tempo de retenção em 8,5 min e a segunda substância (BFR-3) como sendo o pico 3, com tempo de retenção em 12,2 min.

Através da análise do espectro de RMN ^1H (MeOD, 500 MHz, **Figura 25**) foi possível identificar duas metoxilas centradas em δ 3,88 e 3,90, um hidrogênio em δ 6,22 apresentado como um singlete e dois dubletos em δ 7,26 (d, $J = 9,0$ Hz) e 7,36 (d, $J = 9,0$ Hz) correlacionados com estereoquímica orto.

Figura 24- Cromatograma da fração BFRE-2 CHCl_3 -4 obtido por CLAE (370 nm) com eluição isocrática de $\text{CNCH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (45:55)



Comparando-se o espectro de RMN ^1H de BFR-3 e BFR-4, percebe-se que ambos são muito similares, porém observa-se claramente a diferença entre eles: enquanto BFR-3 possui absorção referente a três grupos metoxilas, BFR-4 possui apenas dois grupos. Além disso, no espectro de BFR-3 é possível observar o hidrogênio permutável com D_2O em δ 13,03 e embora BFR-4 também o possua, não é possível visualizá-lo.

O espectro de RMN ^{13}C de ambas as substâncias também são muito similares. O espectro de BFR-4 (MeOD, 125 MHz, **Figura 26**) também apresenta absorções para treze carbonos sp^2 entre δ 98,9 e 160,1. Apresenta ainda duas absorções características de grupos metoxilas com aglomeração estérica envolta de ambos os grupos em δ 61,9 e 62,4. E a absorção da carbonila de cetona é observada em δ 182,5.

As comparações dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C de BFR-3 e BFR-4 foram bastante eficientes para a identificação do composto BFR-4 como uma xantona dimetoxilada.

Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) de BFR-4

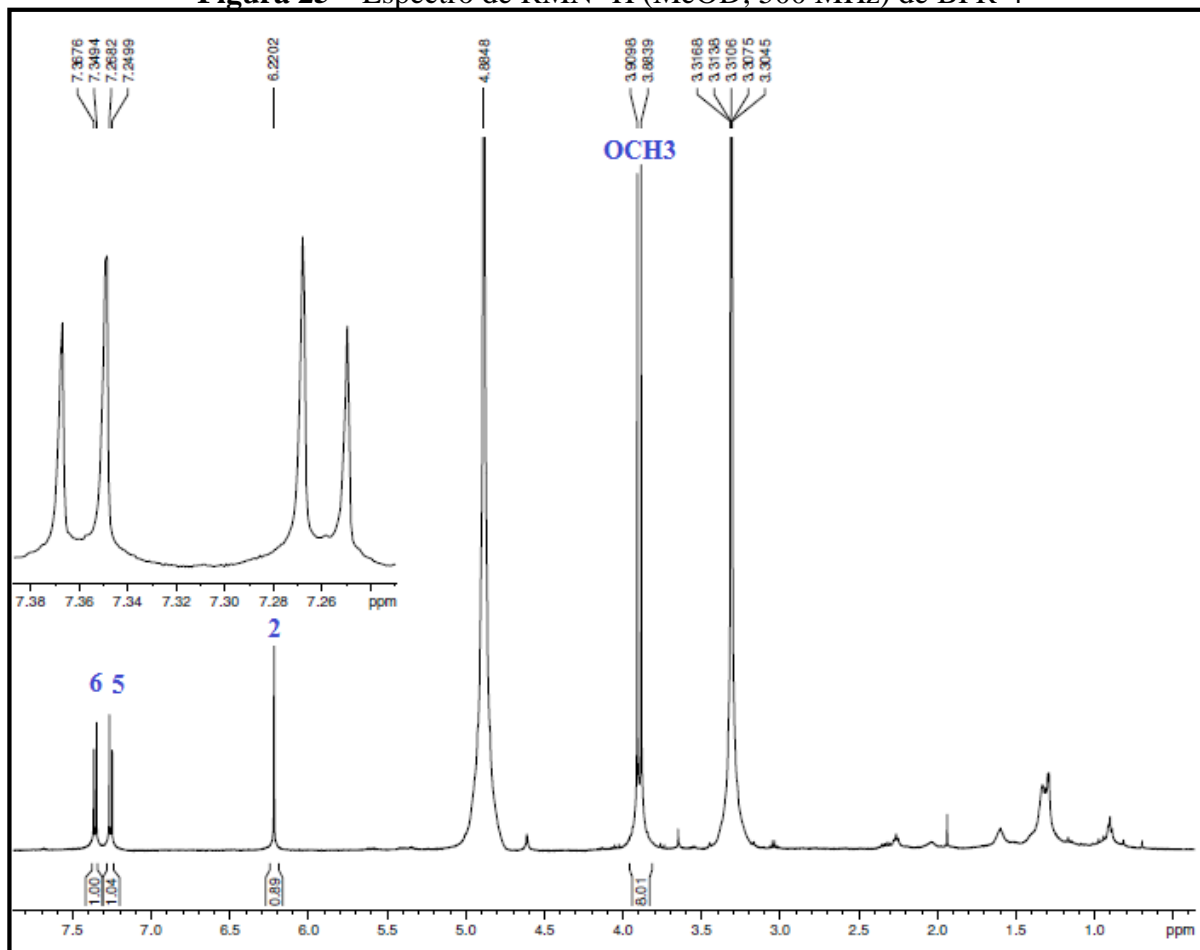
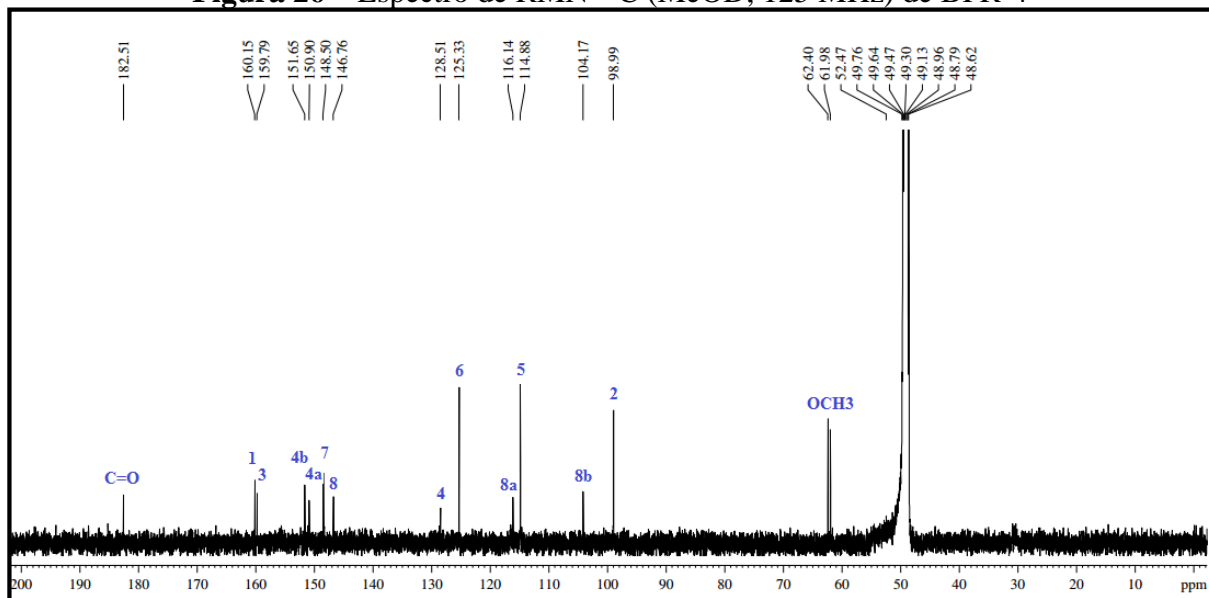
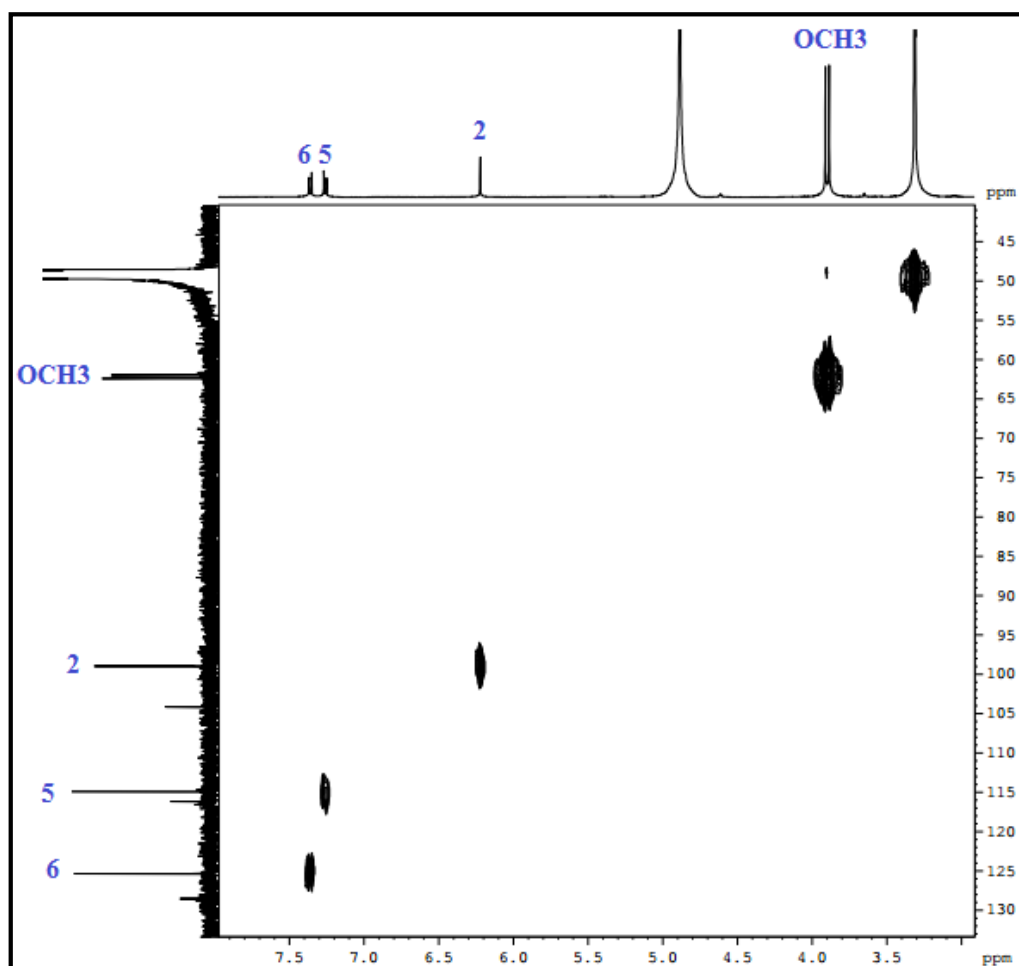


Figura 26 – Espectro de RMN ^{13}C (MeOD, 125 MHz) de BFR-4



Através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ($^1J_{H,C}$) – HMQC (Figura 27) foi possível correlacionar os hidrogênios pertencentes a cada anel aromático aos seus respectivos carbonos. Deste modo, foi possível correlacionar o hidrogênio centrado em δ 6,22 com o carbono em δ 98,9, o hidrogênio em δ 7,26 com o carbono em δ 114,8. E o hidrogênio com absorção em δ 7,36 com o carbono em δ 125,3.

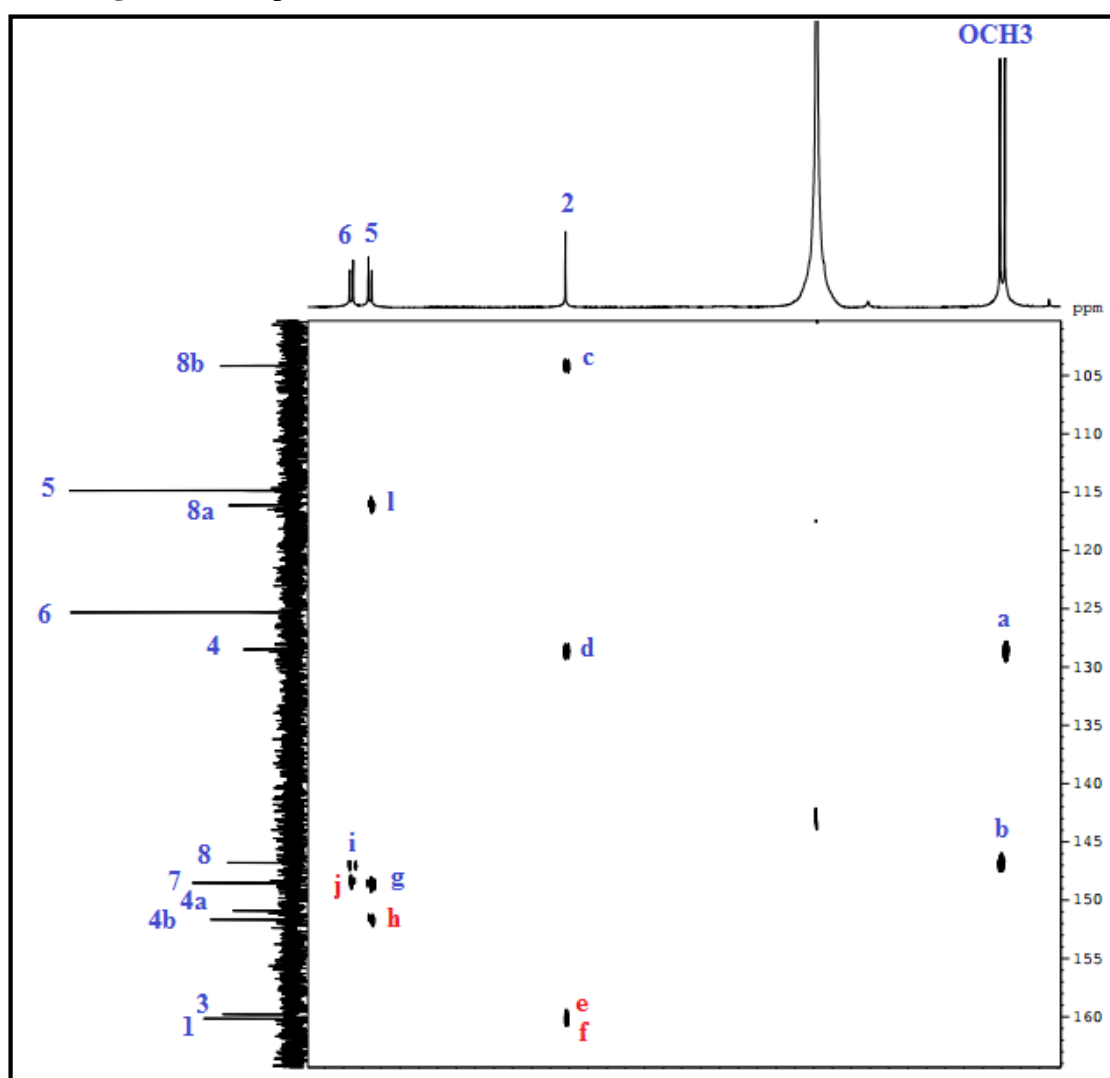
Figura 27 - Espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1J_{H,C}$) – HMQC (MeOD) de BFR-4



Analisando o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear – HMBC (MeOD, Figura 28) foi possível visualizar a correlação a três ligações ($^3J_{H,C}$) existente entre as metoxilas com absorção em δ 3,86 e 3,96 com os carbonos em δ 128,5 (C-4) e 146,7 (C-8), respectivamente, comprovando o posicionamento destas na molécula. Continuando a análise, verificou-se ainda que o hidrogênio com deslocamento em δ 6,22 se correlaciona a três ligações ($^3J_{H,C}$) com os carbonos centrados em δ 103,4 (C-8b) e 128,5 (C-4) e ainda a duas ligações ($^2J_{H,C}$) com os carbonos com absorção em δ 160,1 (C-1) e 159,7 (C-3).

O espectro bidimensional - HMBC ainda mostrou as correlações a três ligações ($^3J_{H,C}$) entre o hidrogênio com absorção em δ 7,26 e os carbonos em δ 116,1 (C-8a) e 148,5 (C-7), e a correlação a duas ligações ($^2J_{H,C}$) com o carbono em δ 151,6 (C-4b). Ficou evidente ainda a correlação a duas ligações ($^2J_{H,C}$) entre o hidrogênio em δ 7,36 e o carbono em δ 148,5 (C-7) e a correlação a três ligações ($^3J_{H,C}$) com o carbono em δ 146,7 (C-8). Para melhor visualização, as correlações a três ligações ($^3J_{H,C}$) foram assinaladas no espectro com a cor azul e as correlações a duas ligações ($^2J_{H,C}$) foram assinaladas com a cor vermelho.

Figura 28 - Espectro de RMN bidimensional – HMBC (MeOD) de BFR-4

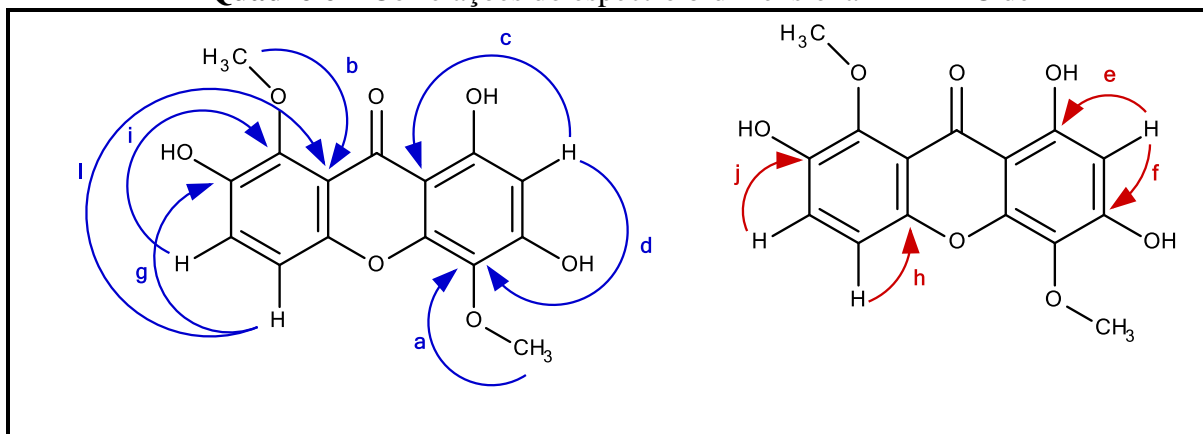


Todas as correlações obtidas a partir do espectro de correlação heteronuclear - HMBC discutidas até aqui se encontram no **Quadro 6**.

Tanto os dados de RMN ^1H e ^{13}C como as correlações obtidas a partir do espectro HSQC e HMBC e os dados descritos na literatura (SILVEIRA et al., 1995) para BFR-4 encontram-se discriminados na **Tabela 20**.

Baseado nos dados espectrais apresentados e na comparação com os dados descritos na literatura foi possível concluir que BFR-4 tratava-se de 1,3,7-trihidroxi-4,8-dimetóxicxantona (**Figura 29**), uma xantona já anteriormente isolada desta mesma espécie (SILVEIRA et al., 1995).

Quadro 6 – Correlações do espectro bidimensional – HMBC de BFR-4



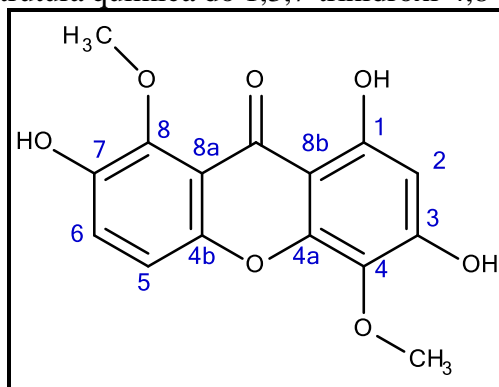
Fonte: próprio autor, 2015

Tabela 20 - Dados de RMN ^1H (MeOD, 500 MHz) e ^{13}C (MeOD, 125 MHz) da substância BFR-4 segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC e HMBC em comparação com os dados da literatura.

C	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ C}^*$	$\delta\text{ H}$ (mult., int., J/Hz)	$\delta\text{ H}$ (mult., int., J/Hz)*
1	160,1	159,8		
2	98,9	98,4	6,22 (s, 1 H)	6,25 (s, 1 H)
3	159,7	158,8		
4	128,5	127,8		
4a	150,9	150,0		
4b	151,6	151,0		
5	114,8	114,4	7,26 (d, 1 H, $J = 9,0$)	7,28 (d, 1 H, $J = 9,0$)
6	125,3	124,4	7,36 (d, 1 H, $J = 9,0$)	7,41 (d, 1 H, $J = 9,0$)
7	148,5	147,8		
8	146,7	146,1		
8a	116,1	116,3		
8b	104,1	103,4		
C=O	182,5	181,6		
OMe	62,4	62,2	3,88 (s, 3 H)	3,87 (s, 3 H)
OMe	61,9	61,7	3,90 (s, 3 H)	3,90 (s, 3 H)

* Os dados de RMN ^1H foram obtidos em 200 MHz, Acetona- d_6 e os de RMN ^{13}C em 100 MHz, Acetona- d_6 (SILVEIRA et al., 1995).

Figura 29 – Estrutura química do 1,3,7-trihidróxi-4,8-dimetóxi-xantona



6.2.5 BFR-5

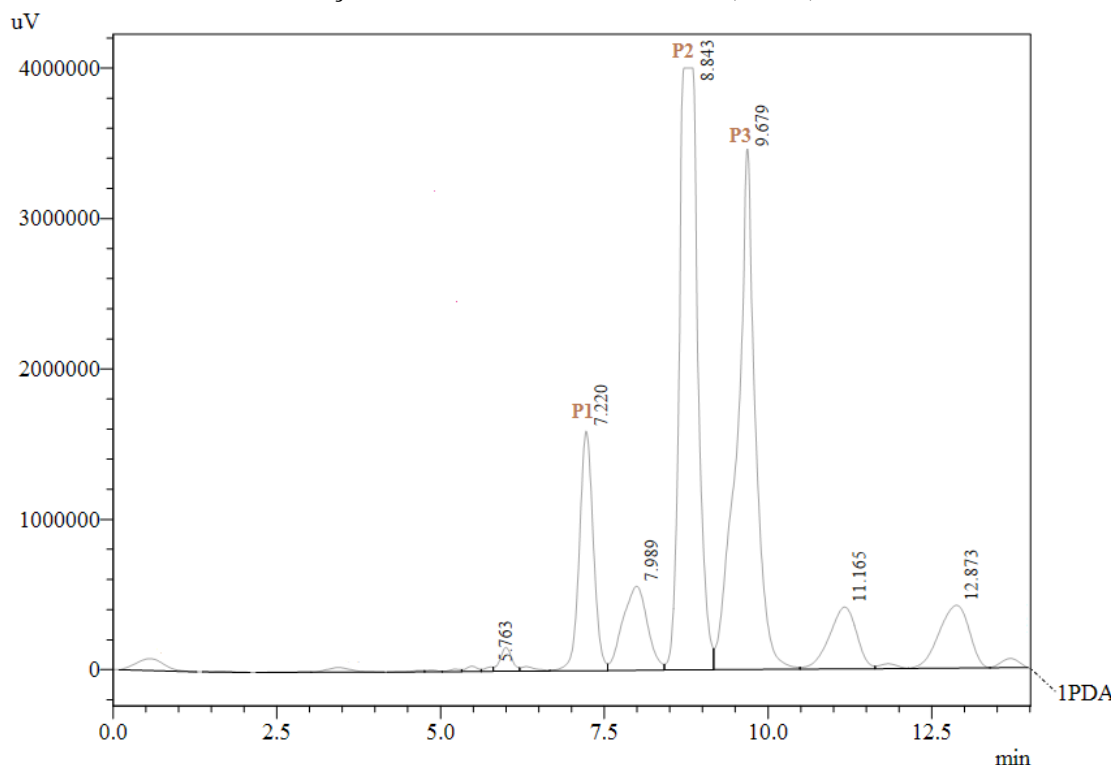
A partir do fracionamento cromatográfico em sílica flash e purificação por CLAE da fração clorofórmica proveniente da partição do extrato etanólico das raízes de *B. floribunda* foi obtida BFR-5. Foram obtidos 10,5 mg de BFRE-5 na forma de um sólido amarelo claro cristalino e solúvel em clorofórmio.

O tratamento da fração BFRE-2-CHCl₃-1 por CLAE levou ao isolamento de duas substâncias. No cromatograma obtido (**Figura 30**) foi possível identificar a primeira substância (BFR-5) como sendo o pico 1, com tempo de retenção em 7,2 min e a segunda substância (BFR-3) como sendo o pico 3, com tempo de retenção em 9,6 min.

O espectro de RMN ¹H (DMSO, 500 MHz, **Figura 31**) mostrou-se muito similar aos espectros das outras xantonas isoladas anteriormente. Apresentou duas absorções de grupos metoxilas em δ 3,68 e 3,76. Duas absorções em δ 7,09 (d, J = 9,0 Hz) e 7,21 (d, J = 9,0 Hz) características de hidrogênios ligados a anel aromático orto posicionados. Mas a grande diferença entre esses espectros é marcada pela ausência do hidrogênio em aproximadamente δ 6,5, bastante característico do anel A das xantonas anteriormente isoladas desse gênero. Essa informação foi bastante significativa, pois levou a identificação de uma xantona inédita para esta espécie e para o gênero também.

O espectro de RMN ¹³C (DMSO, 125 MHz, **Figura 32**) mostrou absorções características de carbonos sp² oxigenados e uma absorção de carbonila de cetona em δ 182,8, bem característicos de compostos xantônicos. Além disso, é possível observar as absorções referentes aos grupos metoxilas em δ 61,1 e 59,9 indicativos de grupos com aglomeração estérica em seu entorno.

Figura 30- Cromatograma da fração BFRE-2 CHCl_3 -1 obtido por CLAE (370 nm) com eluição isocrática de $\text{CNCH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (50:50)



Também foi possível visualizar no espectro de RMN bidimensional- HMBC (DMSO, **Figura 33**) o acoplamento existente entre os hidrogênios da metoxila centrada em δ 3,76 e a carbonila em δ 182,8. Com as características observadas até aqui foi proposta uma estrutura para o composto BFR-5 (**Figura 34**), embora essa proposta ainda não seja conclusiva, já que necessita de outras análises para se chegar a estrutura real.

Pesquisa realizada no *Scifinder* para verificar as possibilidades de moléculas existentes com as características citadas acima levou a conclusão de que esta molécula também é possivelmente inédita na literatura, já que não existe registro de nenhuma xantona com essas características.

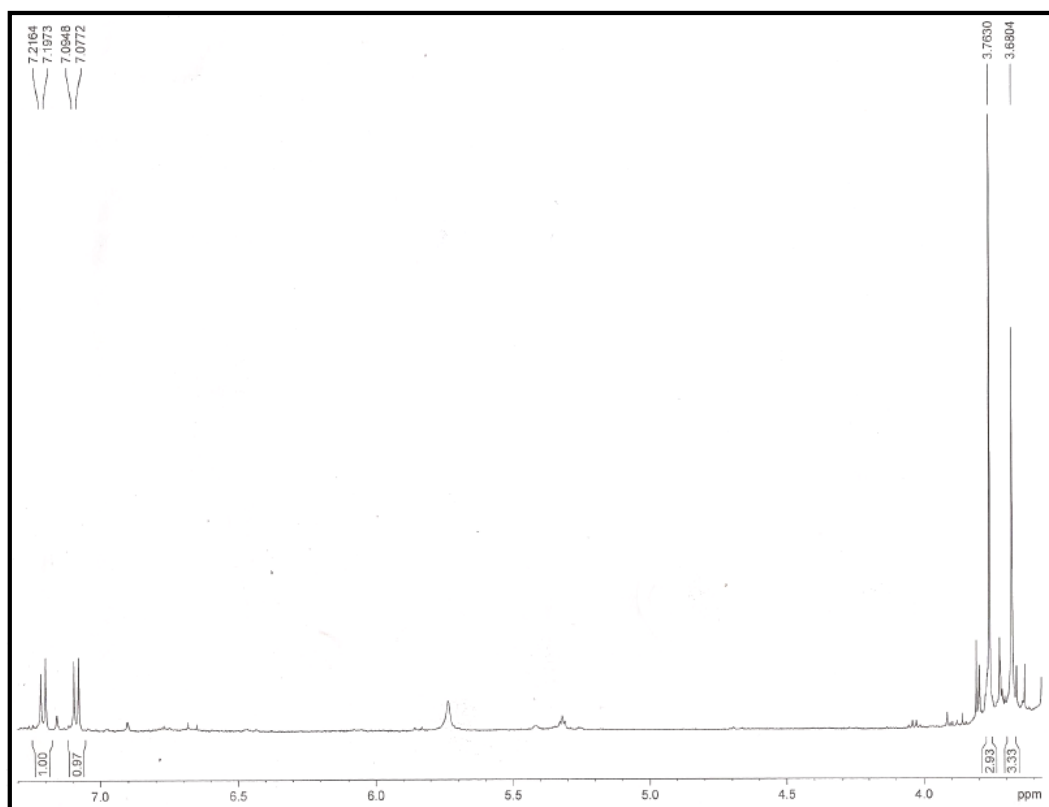
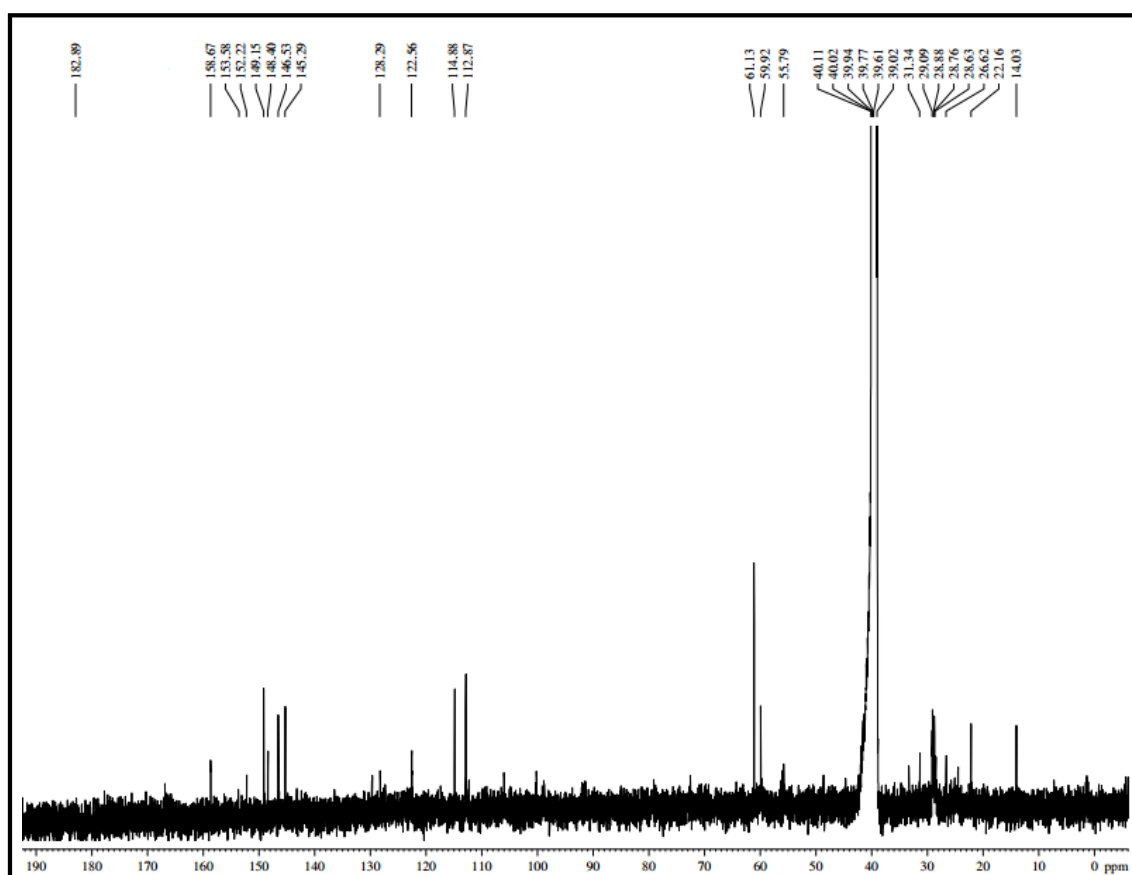
Figura 31 – Espectro de RMN ^1H (DMSO, 500 MHz) de BFR-5**Figura 32** - Espectro de RMN ^{13}C (DMSO, 125 MHz) de BFR-5

Figura 33 - Espectro de RMN bidimensional HMBC (DMSO) de BFR-5

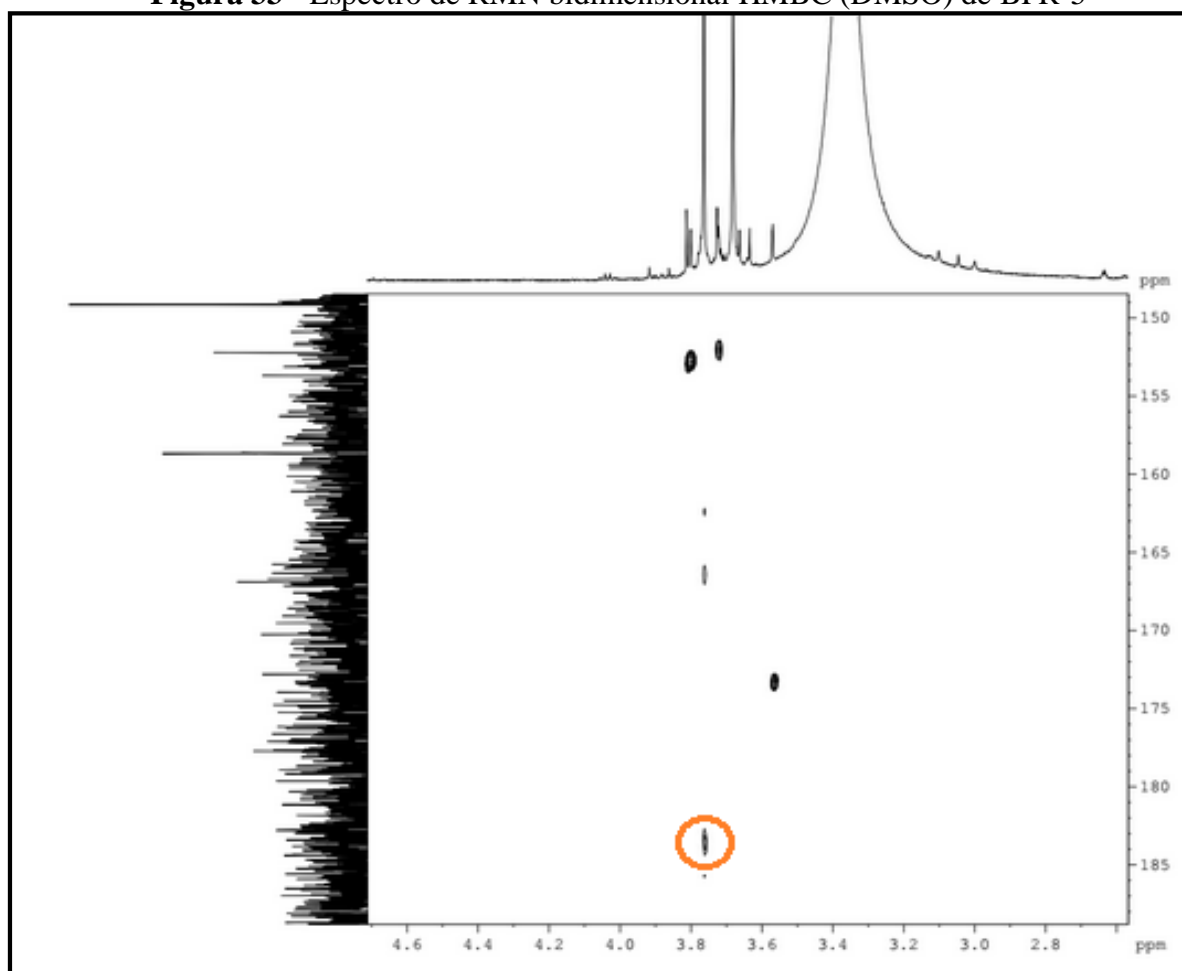
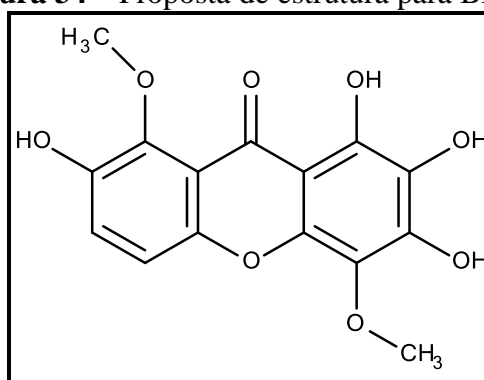


Figura 34 – Proposta de estrutura para BFR-5



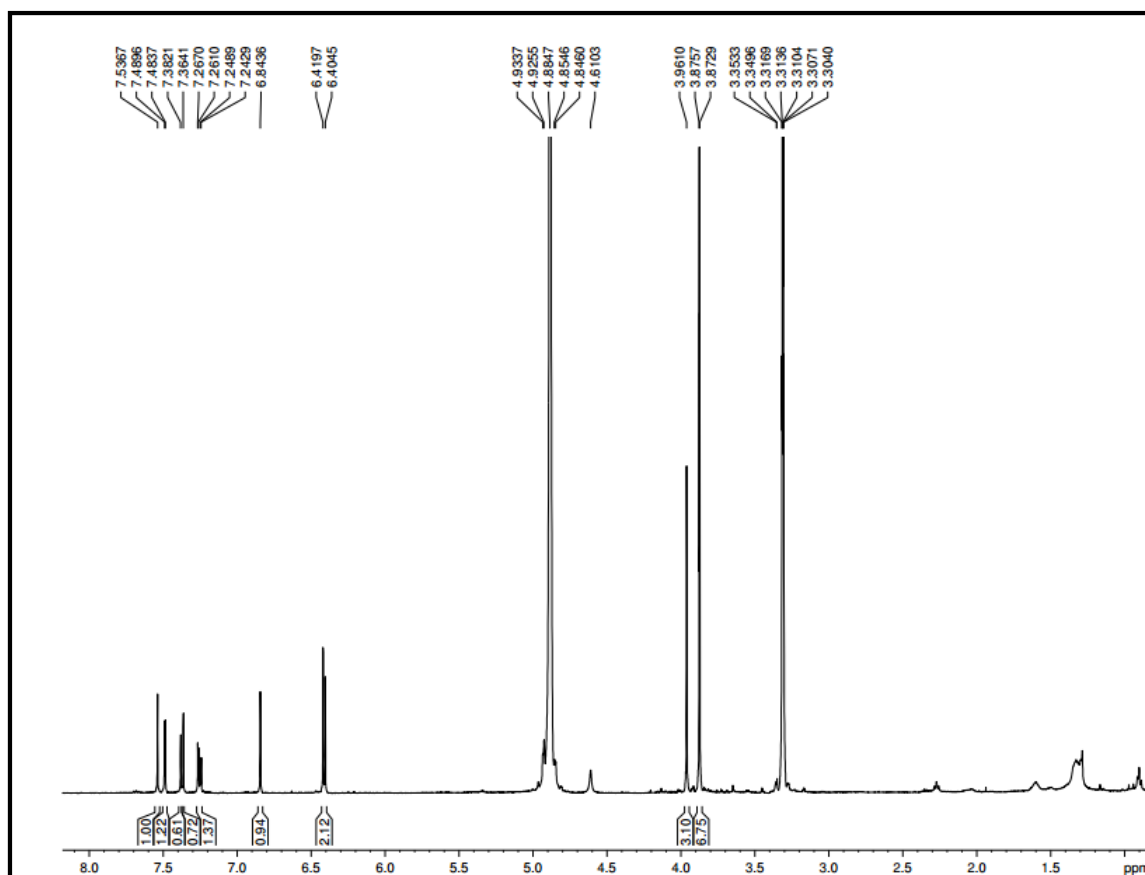
6.2.6 Discussão sobre o pico 2 encontrado nos cromatogramas de BFRE-2 CHCl₃-1 e BFRE-2 CHCl₃-4

Após submeter às frações BFRE-2 CHCl₃-1 e BFRE-2 CHCl₃-4 à análise por CLAE, as frações coletadas referentes ao pico 2 (P2, m= 25 mg) nos cromatogramas (**Figura 30** e **Figura 24**) foram analisadas utilizando RMN.

Os espectros de RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) e ¹³C (MeOD, 125 MHz) das duas amostras mostraram-se muito similares, apresentando as mesmas absorções características das xantonas anteriormente descritas, por isso apenas um deles foi analisado.

Analisando o espectro de RMN ¹H (**Figura 35**) foi possível identificar sinais característicos das xantonas anteriormente relatadas, como as absorções referentes aos grupos metoxilas em δ 3,87 e 3,96. Os hidrogênios pertencentes ao anel A bastante comum a esse tipo de composto aparecem em δ 6,40 e 6,41, além disso várias absorções entre δ 6,84 e 7,53, com alguns dubletos orto posicionados característicos do anel B são evidenciados no espectro. Embora os sinais sejam bastante elucidativos, as quantidades de hidrogênios integrados dão a certeza de uma mistura de xantonas.

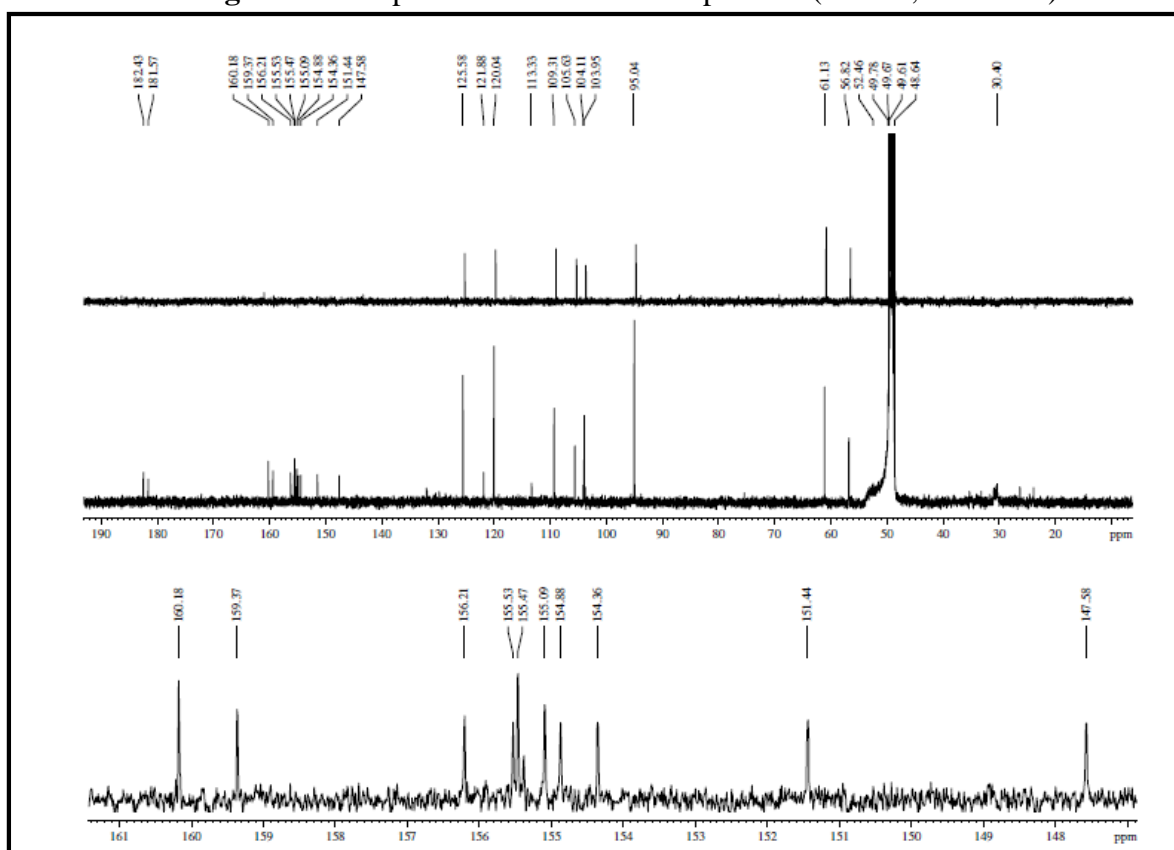
Figura 35- Espectro de RMN ¹H (MeOD, 500 MHz) de P2



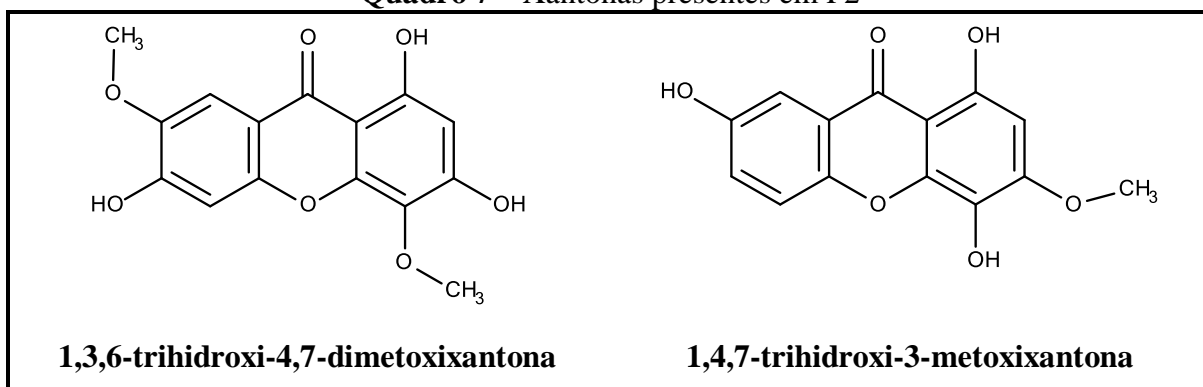
O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 36**) indicou que se tratava de uma mistura de xantonas, pois apresentava duas absorções características de cetona com deslocamento em δ 181,5 e 182,4. A quantidade de absorções de carbonos sp^2 também evidenciava essa mistura, já que o número de sinais apresentados é quase o dobro do esperado.

A análise por LC/MS de baixa resolução foi determinante para conclusão de que P2 tratava-se da mistura de duas xantonas, com diferença de massa de 30 unidades, compatível com um grupo metoxila, indicando assim a diferença entre as duas moléculas, P2-1 (MS=304) e P2-2 (MS=274).

Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C e expansões (MeOD, 125 MHz) de P2



A análise dos espectros de RMN 1D e 2D foram compatíveis com os dados sugeridos por espectrometria de massas, indicando que as xantonas presentes na mistura são 1,3,6-trihidroxi-4,7-dimetoxixantona e 1,4,7-trihidroxi-3-metoxixantona, como indicado na **Quadro 7**.

Quadro 7 – Xantonas presentes em P2**6.2.7 BFR-6**

Os mesmos tratamentos cromatográficos utilizados para obtenção das duas primeiras substâncias também levaram ao isolamento de 35,2 mg de um sólido branco, solúvel em água, denominado BFR-3.

Sua elucidação estrutural ainda está em andamento, porém, algumas análises já foram possíveis e estão descritas abaixo.

Através do espectro de RMN ^1H (500 MHz, D_2O , **Figura 37**) foi possível identificar todos os seus hidrogênios compreendidos entre δ 3,2 e 4,0, região bastante específica de carbonos sp^3 oxigenados. O espectro de expansão dessa região (**Figura 38**) mostrou que todos os hidrogênios acoplam, não existindo nenhum sinal característico de singlete.

O espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 75 MHz, **Figura 39**) apresentou oito linhas espectrais com deslocamentos entre δ 60,9 e 80,3 característicos de carbonos oxigenados não anoméricos. Através da comparação do espectro de ^{13}C com o espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135 (**Figura 21**), foi possível destacar dois carbonos do tipo sp^2 centrados em δ 60,9 e 68,8.

Através da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear ($^1J_{\text{H,C}}$) – HMQC (**Figura 40**) foi possível constatar que o carbono sp^2 δ 60,9 estava correlacionado com hidrogênios com absorções em δ 3,7 e 3,9 e que o carbono sp^2 δ 68,8 estava correlacionado com os hidrogênios em δ 4,0 e 3,2, podendo-se concluir então que, os hidrogênios ligados aos carbonos sp^2 possuem ambientes químicos diferentes, sendo então diastereotópicos.

Figura 37 – Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de BFR-6

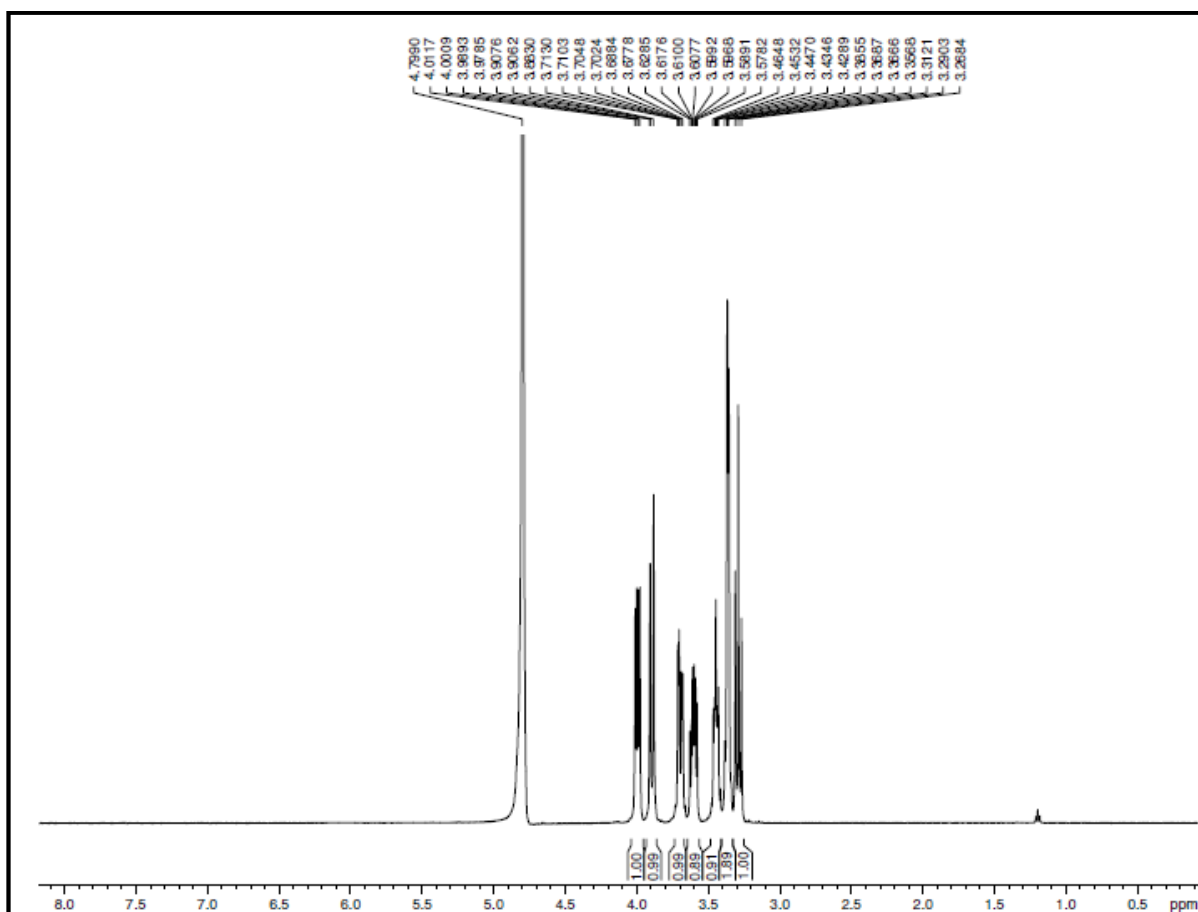
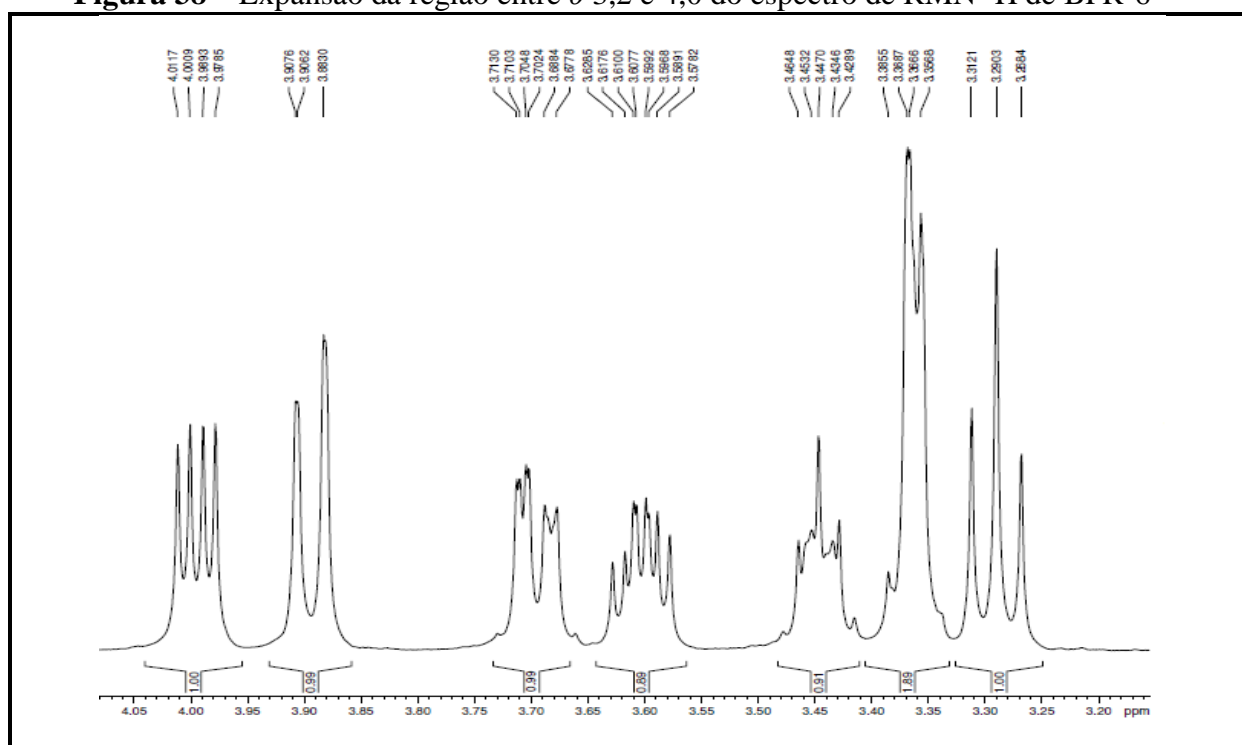


Figura 38 – Expansão da região entre δ 3,2 e 4,0 do espectro de RMN ^1H de BFR-6



Continuando a análise, verificou-se que o carbono com deslocamento δ 69,4 está correlacionado com o hidrogênio δ 3,6, o carbono em δ 69,7 está correlacionado ao hidrogênio em δ 3,3. Os carbonos com absorção em δ 77,5 e 80,3 estão correlacionados com os hidrogênios centrados em δ 3,4 e 3,3, respectivamente. No espectro, cada correlação foi registrada com uma cor diferente para melhor visualização. Os valores das correlações obtidas estão relacionados na **Tabela 21**.

Com a análise do espectro de RMN correlação homonuclear COSY (**Figura 41**) foi possível observar os acoplamentos existentes entre os hidrogênios com deslocamento em δ 4,00 e δ 3,29, ambos ligados ao mesmo carbono (δ 68,8), comprovando-se mais uma vez que eles são diastereotópicos. Também foi possível observar os acoplamentos entre os hidrogênios em δ 3,90 e δ 3,60, e deste com o δ 3,44, corroborando com a estrutura proposta na **Figura 23**.

Figura 39 – Espectro RMN ^{13}C e DEPT 135° (D_2O , 75 MHz) de BFR-6

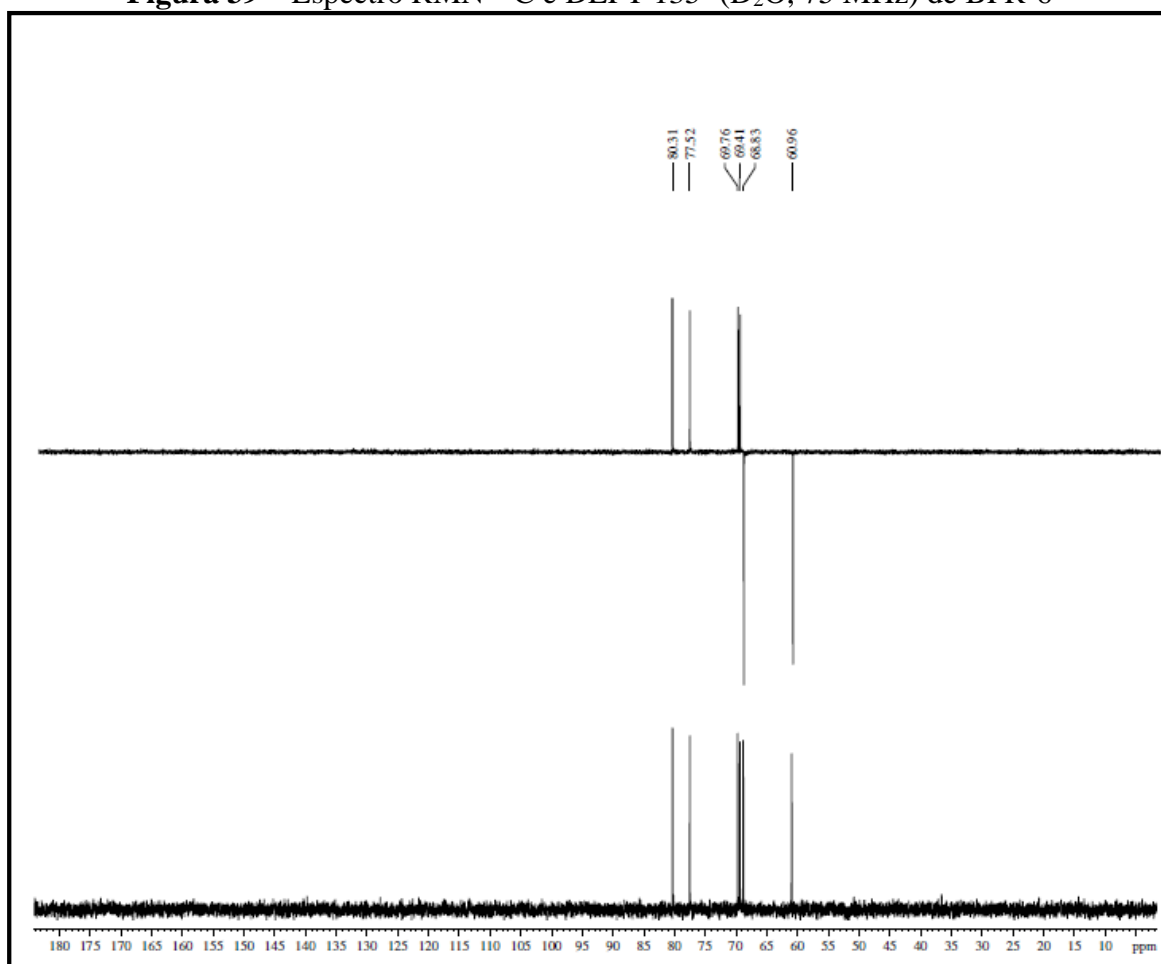


Figura 40 – Espectro de RMN correlação heteronuclear-HMQC (D_2O) de BFR-6

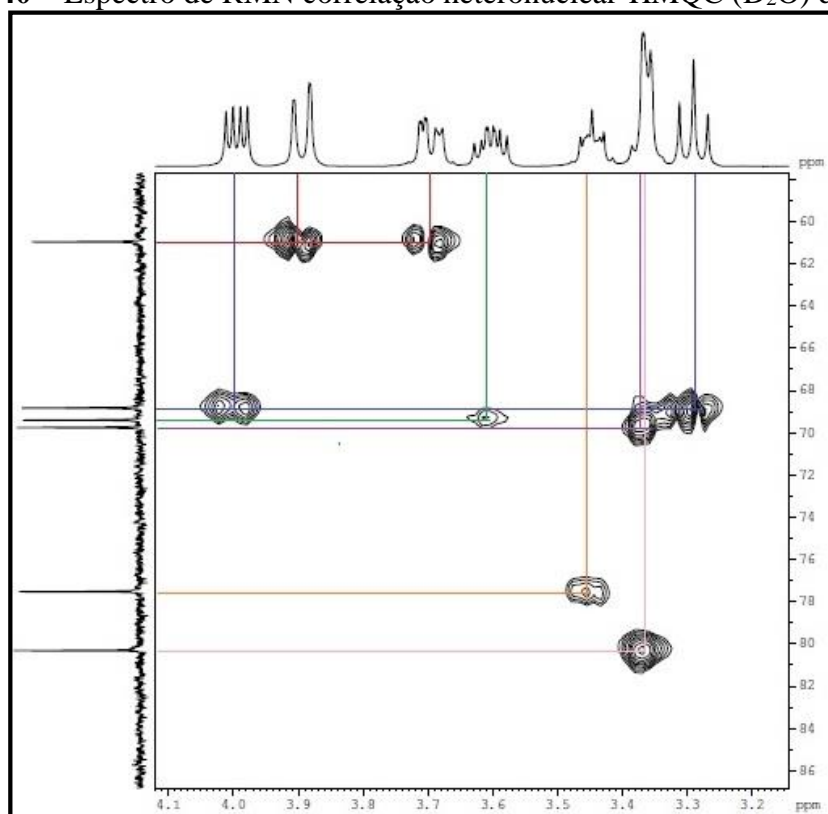


Figura 41 – Espectro de correlação homonuclear – COSY (D_2O) de BFR-6

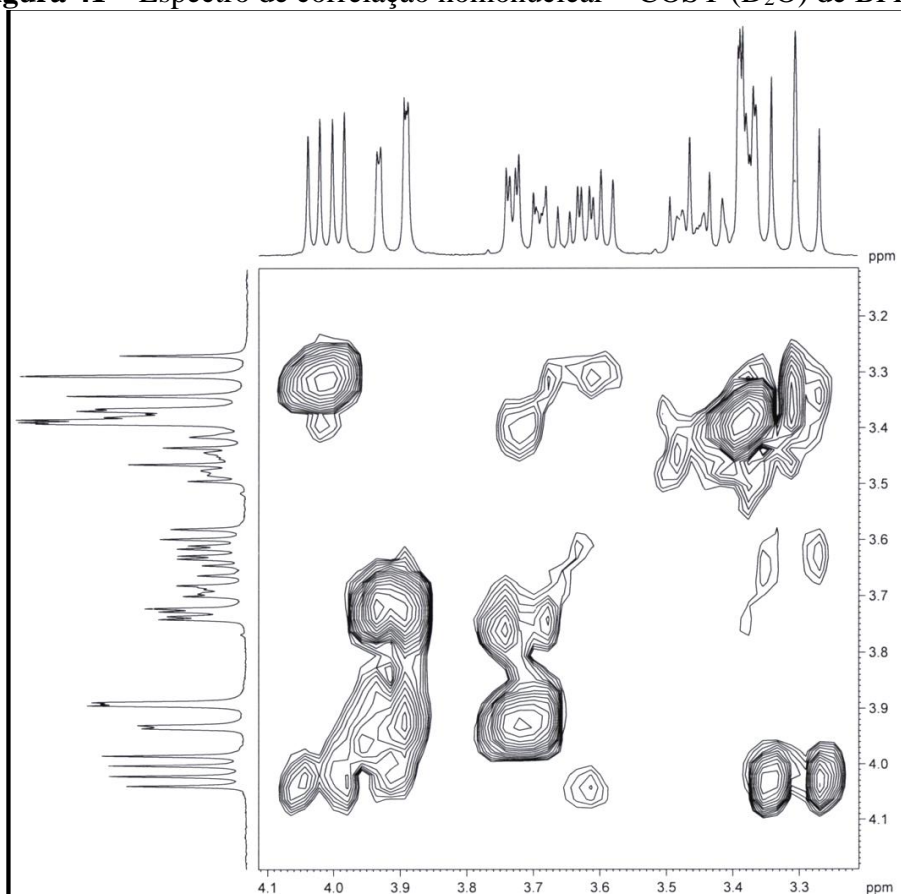
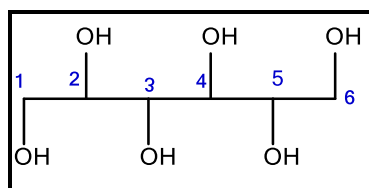
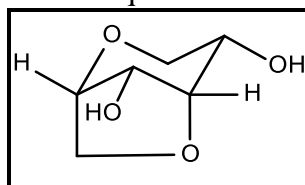


Tabela 21- Correlações obtidas a partir do espectro bidimensional HMQC de BFR-6

δ RMN ^{13}C (500 MHz, D_2O)	δ RMN ^1H (75 MHz, D_2O)-HMQC (int.,mult.)
60,9	3,70 (qd, 1 H); 3,90 (dd, 1H)
68,8	3,29 (t, 1 H); 4,00 (qd, 1H)
69,4	3,60 (mult, 1H)
69,7	3,36 (mult, 1H)
77,5	3,44 (mult, 1H)
80,3	3,36 (mult, 1H)

O composto BFR-6 é um derivado do carboidrato Manitol (**Figura 42**), que após sofrer dupla desidratação entre os carbonos C1 e C5 e entre C3 e C6, tornou-se um poliálcool bicíclico (**Figura 43**).

Figura 42 – Estrutura do Manitol**Figura 43** – Estrutura química do composto BFR-6

6.2.8 BFR-7

Após sucessivos tratamentos cromatográficos do extrato etanólico das raízes de *Bredemeyera floribunda*, a fração BFRE-1A8 foi submetida à análise por RMN ^1H e ^{13}C . O espectro de ^{13}C (125 MHz, DMSO, **Figura 44**) revelou que esta fração era muito promissora por indicar a presença de saponina triterpênica glicosilada através de absorções características de carbonos sp^3 entre δ 15,2 e 47,8. Além disso, os sinais dos carbonos sp^2 em δ 128,3 (C-12) e 138,5 (C-13) são característicos de aglicona do tipo presenegenina, já descrita na literatura para esta espécie. Os carboidratos foram observados na região do espectro entre δ 60,7 e 82,4 e os carbonos anoméricos foram observados entre δ 91,6 e 109,7. Do mesmo modo, o espectro ainda revelou a presença de duas carbonilas em δ 169,1 e 169,8, também características dessa classe.

Embora o espectro fosse bastante elucidativo, o cromatograma obtido pela análise por CLAE (**Figura 45**) revelou que esta fração ainda não estava pura, porém permitiu uma boa

separação dos compostos, passando-se então a amostra por um novo fracionamento cromatográfico. Este procedimento levou ao isolamento de 9,0 mg de um sólido amorfo, amarelo claro, solúvel em água, denominado BFR-4, apontado no cromatograma como P2.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, **Figura 46**) mostrou absorções características de um dissacarídeo entre δ 4,1 e 6,2, além da absorção de hidrogênio anomérico apresentado como um dubleto em δ 6,21 (1H, $J = 3,35$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, **Figura 47**) evidenciou claramente que o composto tratava-se de um carboidrato por possuir os seus doze carbonos numa região específica de carbonos oxigenados entre δ 62,67 e 106,11, sendo três deles atribuídos a carbonos metilênicos em δ 62,67 (C_6), 63,23 (C_{12}) e 64,97 (C_{11}) que foram confirmados no espectro DEPT-135, **Figura 47**. Indicou ainda que o composto era formado por frutose e glicose, possuindo apenas um carbono anomérico em δ 106,11.

Com o intuito de obter uma atribuição ainda mais segura de que o composto se tratava da sacarose (**Figura 48**), foi realizada a comparação com dados da literatura e esses dados foram dispostos na **Tabela 22**.

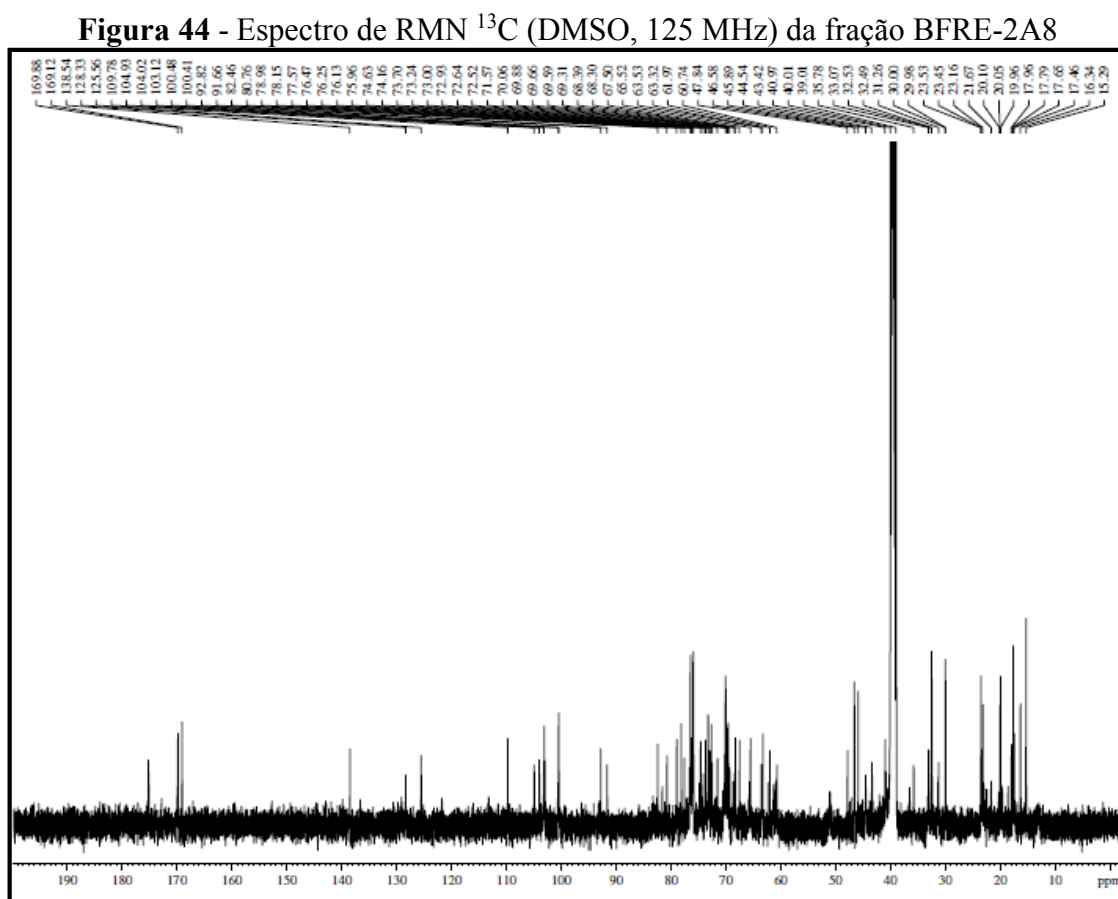


Figura 45 – Cromatograma da fração BFRE-2A8 obtido por CLAE (200 nm) com eluição isocrática de MeOH/H₂O(15:85)

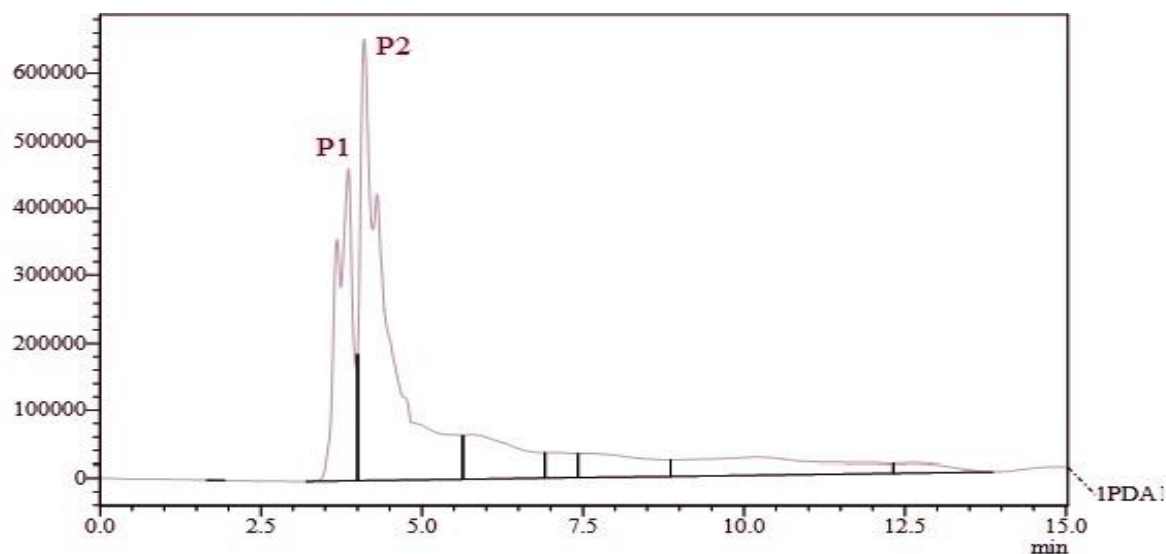


Figura 46 – Espectro de RMN ¹H (C₅D₅N, 500 MHz) de BFR-7

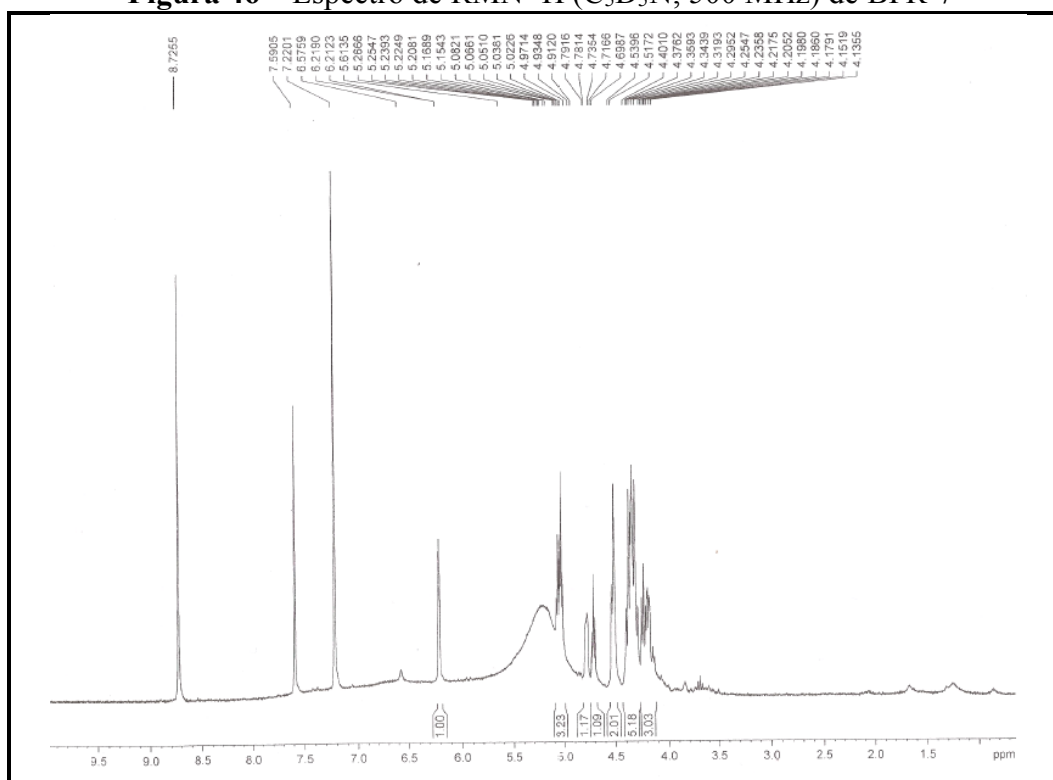


Figura 47 - Espectro de RMN ¹³C e DEPT 135° (C₅D₅N, 125 MHz) de BFR-7

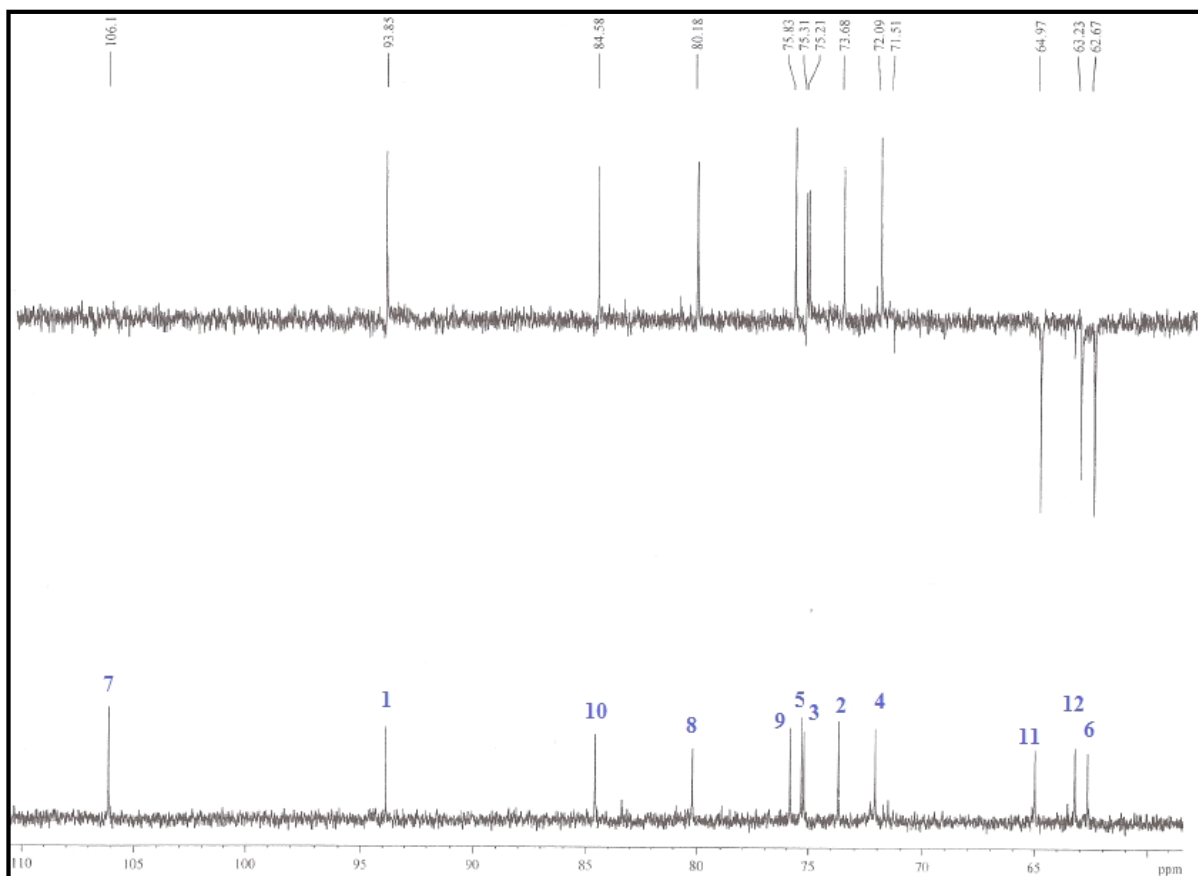
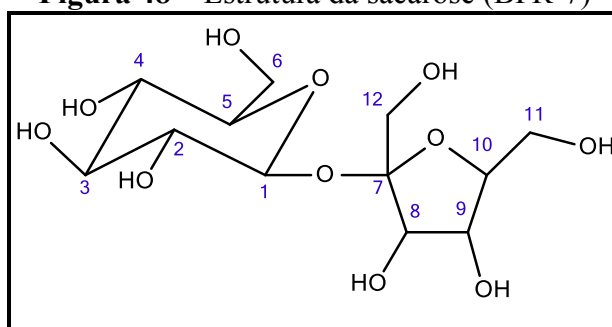


Figura 48 – Estrutura da sacarose (BFR-7)



Sendo a sacarose uma substância que apresenta grande importância como nutriente para os mais variados organismos (AVGARD; DEY, 1997), pesquisas revelam a atividade biológica da mesma e de seus derivados. Segundo Oliveira e seus colaboradores (OLIVEIRA *et al*, 2007), a sacarose mostrou-se uma das substâncias nematicidas presente no bulbo da cebola. Além disso, produtos naturais ricos em sacarose são apontados com atividade biológica contra *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida tropicalis* e *Candida albicans* (KÜÇÜK *et al.*, 2007).

Tabela 22 - Dados de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) da substância BFR-7 em comparação com os dados da literatura.

C	δ C (ppm)	δ C* (ppm)
1	93,8	91,7
2	73,6	71,6
3	75,2	72,8
4	72,0	69,8
5	75,2	72,8
6	62,6	60,5
7	106,1	104,3
8	80,1	77,1
9	75,8	74,3
10	84,5	82,5
11	64,9	62,5
12	63,2	62,1

*Os dados de RMN ^{13}C foram obtidos em dimetilssulfóxido deuterado DMSO- d_6 e em 125 MHz (OLIVEIRA et al., 2007).

6.3 IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS EM FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DAS RAÍZES DE *Bredemeyera floribunda* Willd

6.3.1 BFRE-2A2

Após sucessivos tratamentos cromatográficos do extrato etanólico da raiz de *B. floribunda* foi obtida a fração BFRE-2A2. Esta fração foi submetida à análise por RMN ^{13}C e o espectro (D_2O , 125 MHz, **Figura 49**) obtido revelou tratar-se de uma mistura de saponinas.

Embora o espectro seja claro em relação à presença de saponina triterpênica glicosilada através de absorções características de carbonos sp^3 entre δ 18,1 e 53,3. Além disso, os sinais dos carbonos sp^2 em δ 128,6 (C-12) e 138,7 (C-13) são característicos de aglicona do tipo presenegenina, já descritas na literatura para esta espécie. Os carboidratos foram observados na região do espectro entre δ 61,5 e 84,6 e os carbonos anoméricos foram observados entre δ 94,1 e 110,6. Do mesmo modo, o espectro ainda revelou a presença de três carbonilas em δ 172,7, 176,2 e 184,5, que demonstraram mais uma vez que esta fração tratava-se de uma mistura, já que as saponinas desse tipo possuem apenas duas carbonilas.

A fração BFRE-2A2 também foi submetida à análise por CLAE e o cromatograma obtido (**Figura 50**) corroborou com o espectro de RMN ^{13}C na conclusão de que se tratava efetivamente de uma amostra ainda impura.

A análise das frações BFRE-1A2 e BFRE-1A8 permitiu a identificação de uma classe de substâncias anteriormente isolada dessa espécie, as saponinas. Elas têm estimado valor

biológico, devido às várias atividades desenvolvidas por elas e por isso incentivam a continuação desse trabalho.

Figura 49 - Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 125 MHz) da fração BFRE-2A2

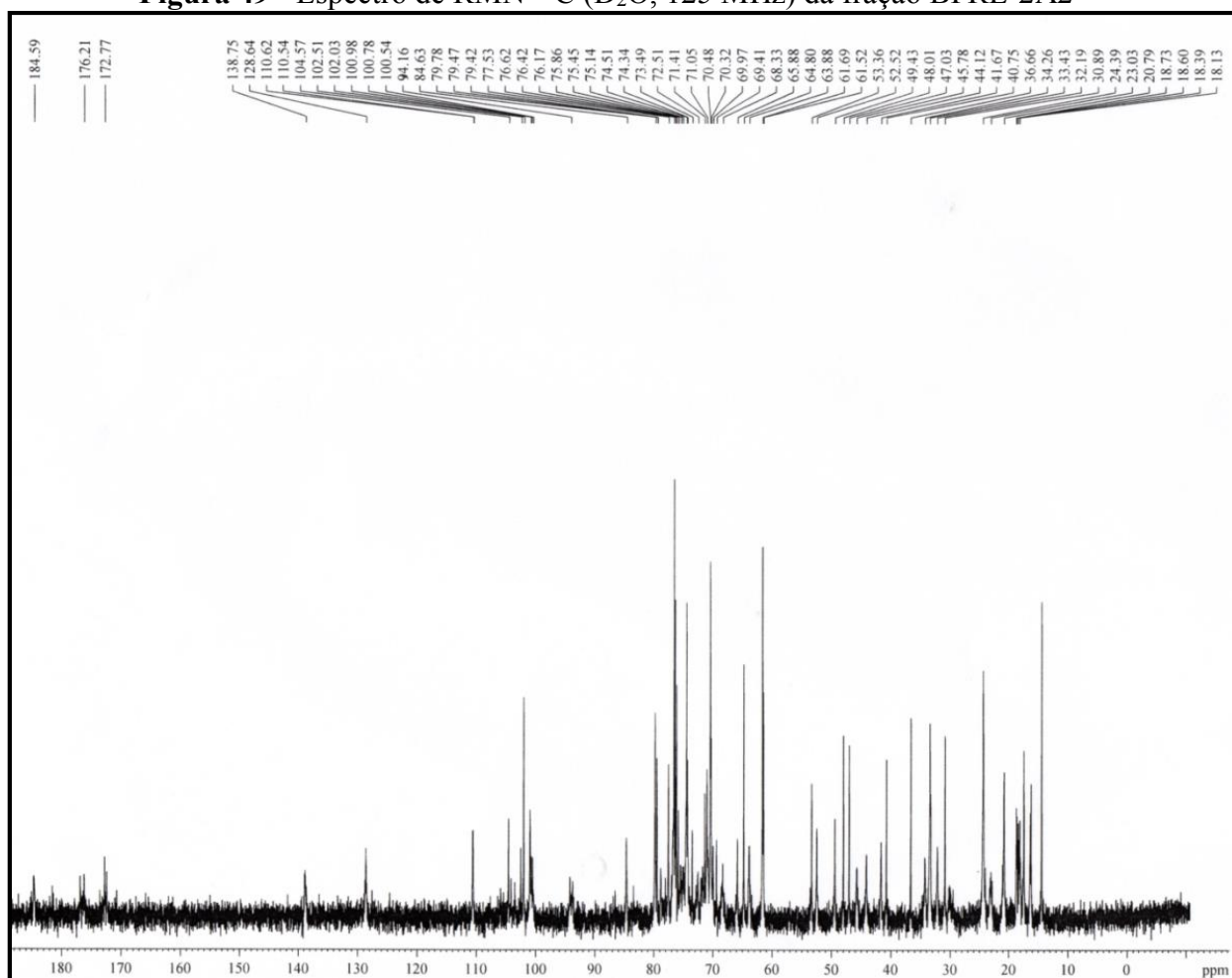
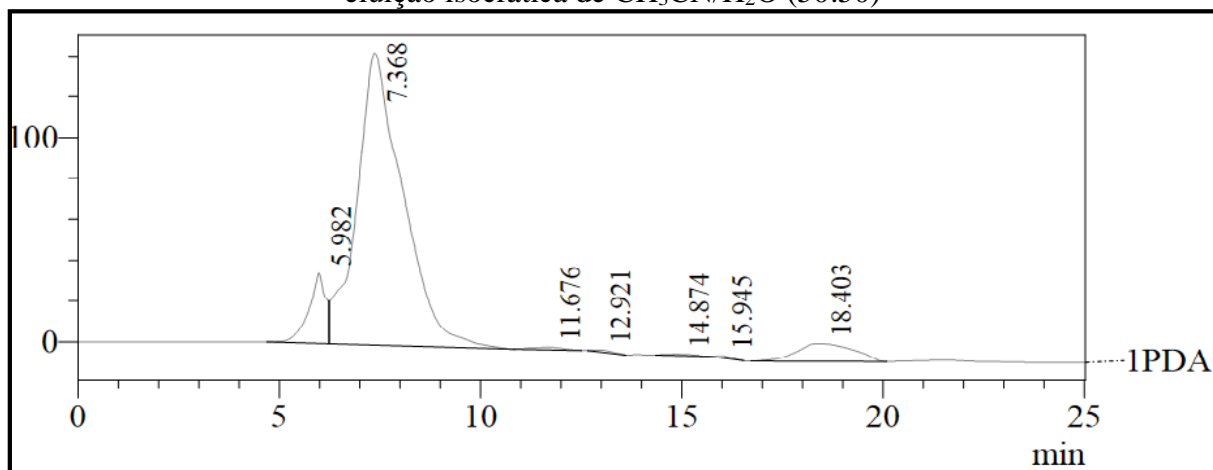


Figura 50 – Cromatograma da fração BFRE-2A2 obtido por CLAE (205 nm) com eluição isocrática de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50)

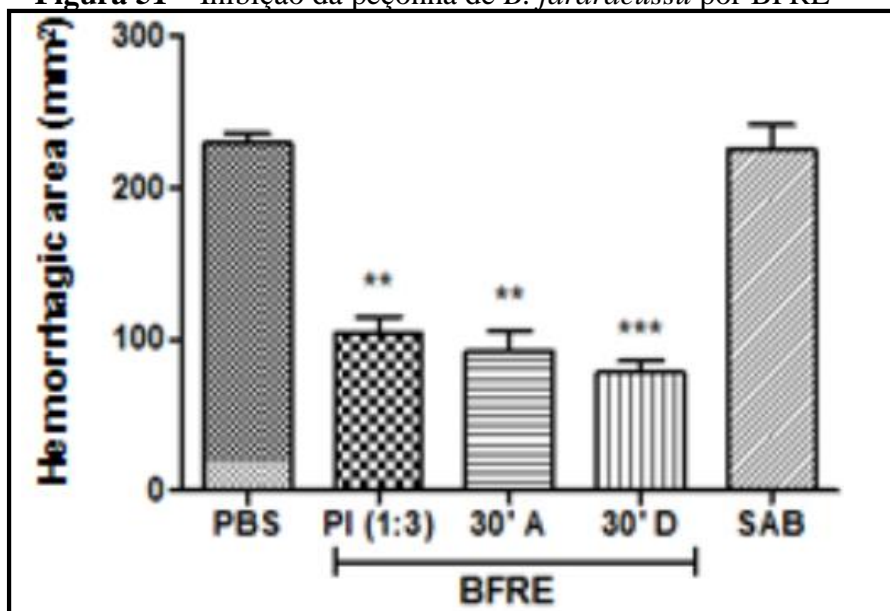


6.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.4.1 Atividade Anti-Hemorrágica

O extrato etanólico de *B. floribunda* (BFRE) e o flavonóide Rutina foram submetidos ao teste hemorrágico *in vivo* utilizando camundongos machos Swiss. O teste gerou resultado promissor para o extrato e está indicado na **Figura 51**.

Figura 51 – Inibição da peçonha de *B. jararacussu* por BFRE



* Os grupos representados são: Veneno de *Bothrops jararacussu* em solução salina (PBS), Soro antibotrópico (SAB), Extrato de etanólico *B. floribunda* (BFRE): Pré-incubado (PI), Administração do extrato 30 min antes (30' A) e Administração do extrato 30 min depois (30' D). A área hemorrágica foi calculada em mm². Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de Bonferroni com * $P < 0,05$ vs vBJu, ** $P < 0,01$ vs vBJu *** $P < 0,001$ vs vBJu; # $P < 0,05$ vs SAB.

A hemorragia causada pela peçonha de *B. jararacussu* foi inibida pelo extrato etanólico de *B. floribunda* nas diferentes proporções testadas. Observou-se que a hemorragia causada pela peçonha utilizada foi mais fortemente inibida quando administrado o extrato (BFRE) 30 min após administrar o veneno. O flavonóide Rutina não apresentou atividade antihemorrágica.

Muitas substâncias antihemorrágicas têm sido isoladas de plantas. E estudos sugerem que a atividade enzimática das peçonhas é alterada pelos extratos naturais através da captação do zinco ou cálcio dos sítios catalíticos, tornando-os inativos, ou pela interação de grupamentos dessas substâncias naturais que podem estar interferindo na conformação estrutural das proteínas (COSTA, 2010).

6.4.2 Atividade AntiProteolítica

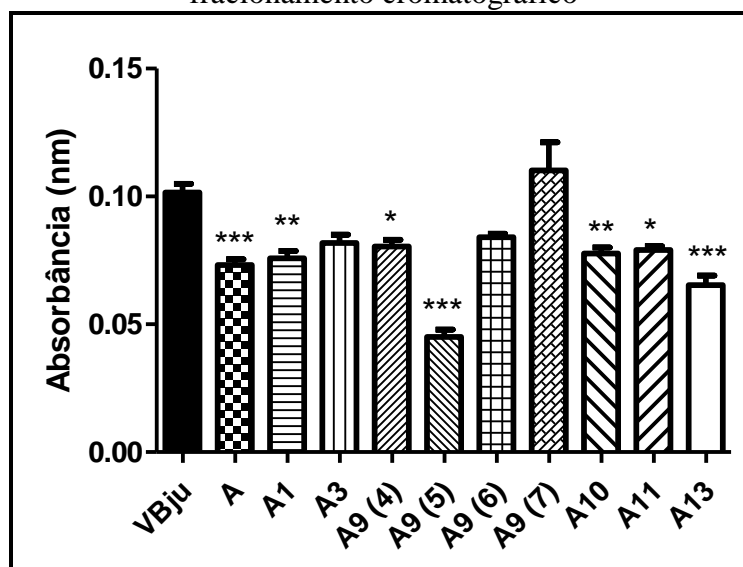
A fração BFRE-2A, bem como algumas frações resultantes do fracionamento da mesma foram conduzidas para teste proteolítico *in vitro*, após análise por RMN das frações BFRE-2A2 e BFRE-2A8 indicarem que saponinas eram os compostos majoritários dessas frações. Na literatura, saponinas são retratadas com forte atividade antiofídica.

A **Figura 52** mostra a atividade proteolítica do veneno de *B. jararacussu* sobre o substrato azocaseína. Os dados apresentados demonstram inibição significativa da atividade proteolítica em todas as concentrações ($P < 0,05$) para quase todas as frações testadas. A atividade proteolítica foi calculada em velocidade da degradação do substrato dada em nmols por minutos por miligrama de veneno.

Das frações testadas, apenas BFRE-2A3, BFRE-2A9(6) e BFRE-2A9(7) não apresentaram resultados positivos. A fração BFRE-2A9(5) apresentou resultado bastante significativo, o que é um indício bastante expressivo da alta concentração de saponina nessa amostra.

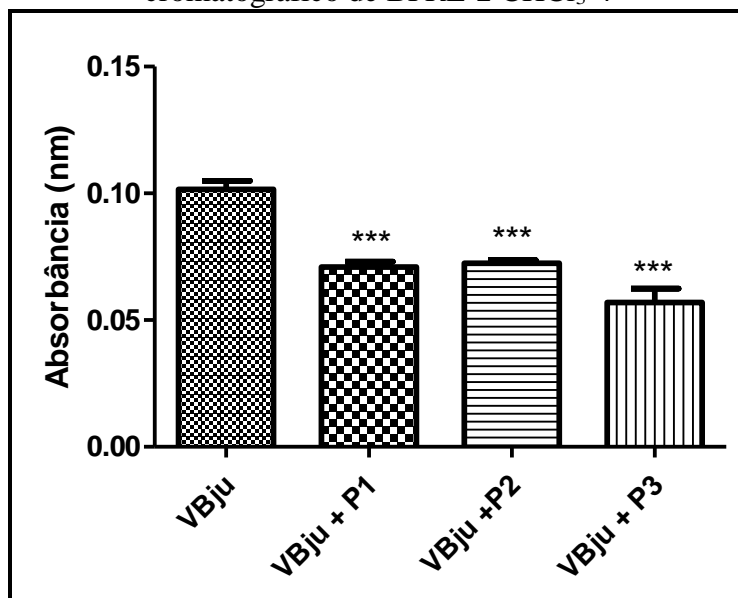
As frações coletadas do fracionamento de BFRE-2 CHCl₃-4 referentes aos picos 1, 2 e 3 também foram submetidas ao teste proteolítico e o resultado está exposto na **Figura 53**.

Figura 52 – Atividade antiproteolítica da fração BFRE-2A e frações obtidas de seu fracionamento cromatográfico



*Os valores da figura representam a atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína das frações BFRE-2A e frações obtidas através do fracionamento cromatográfico da mesma, sobre o veneno de *Bothrops jararacussu* na razão de 1:1, calculado em nm. Resultados expressos como média \pm E.P.M. com nível de significância de * $P < 0,05$ vs VBju ** $P < 0,01$ vs VBju *** $P < 0,001$ vs VBju.

Figura 53 - Atividade antiproteolítica de P1, P2 e P3 obtidas a partir do fracionamento cromatográfico de BFRE-2 CHCl_3 -4



*Os valores da figura representam a atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína das frações de *B. floribunda* sobre o veneno de *Bothrops jararacussu* na razão 1:1, calculado em nm. Resultados expressos como média \pm E.P.M. com nível de significância de * $P < 0,05$ vs VBju ** $P < 0,01$ vs VBju *** $P < 0,001$ vs VBju.

Os resultados foram bastante promissores para todas as frações testadas e surpreendentes também, visto que se tratavam de diversos tipos de xantonas, grupo de substâncias que ainda não tinha relato na literatura sobre esse tipo de atividade. Portanto, trata-se de um resultado inédito, embora necessite de continuidade dos estudos para complementação das informações que relacionem as estruturas à Atividade Proteolítica.

Foram testadas uma xantona dimetoxilada (P1), uma mistura de xantonas mono e dimetoxiladas (P2) e uma xantona trimetoxilada (P3). Sendo a xantona trimetoxilada a que obteve resultado mais expressivo.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho relacionado ao estudo fitoquímico de *Bredemeyera floribunda* Willd, apontou esta espécie como bioprodutora de diversos metabólitos, tais como flavonóides, xantonas, carboidratos, saponinas e derivados cinâmicos.

O estudo fitoquímico do extrato etanólico de *B. floribunda* resultou no isolamento de um derivado cinâmico, de (2E)-3'-(3,4,5-trimetóxfenil)-prop-2-enoato de metila, relatado de forma inédita para este gênero; uma xantona, 1,7-dihidróxi-3,4,8-trimetóxi-xantona, já isolada anteriormente desta espécie e dois carboidratos, sendo um deles bastante comum, a sacarose, e o segundo, com características bastante distintas, um derivado bicíclico do hexitol.

Este trabalho ainda permitiu a identificação de frações do extrato etanólico abundantes em saponinas, já que a literatura reportava isolamento dessa classe apenas para o extrato obtido a partir da mistura de solventes Metanol/Água.

O extrato etanólico de *B. floribunda*, frações obtidas deste e substâncias isoladas foram submetidas a ensaios proteolítico *in vitro* e hemorrágico *in vivo*, utilizando o veneno de *Bothrops jararacussu*, demonstrando resultados promissores, que contribuem para o conhecimento químico e biológico desta espécie e estimulam a continuidade deste estudo.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C. A.; FILHO, J. L. M. A., A família Polygalacea na planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 4, p. 321-328, 2008.
- ALAN, M.I.; GÓMEZ, A., Adjuvant effects and antiserum action potetiation by a (Herbal) compound 2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid isolated from the root extract of the Indian medicinal plant “Sarsaparilla” (*Hemisdesmus indicus* R. BR.). **Toxicon**, v. 36, p. 1423-1431, 1998.
- ALVES, N. T. Q., **Efeito do extrato das raízes de *Bredemeyera floribunda* Willd sobre a ação local do veneno de *Bothrops jararacussu* em camundongos**. 2013. 96 f. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.
- ANDRÈ, J. M., **La medicine à Rome**. Paris: Éditions Tallandier, 2006, 687 p.
- AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S., Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenois saponinas. **Phytochemistry**, v. 72, p. 435-457, 2011.
- AVGAD, G; DEY, P. M., Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. **Plant Biochemistry**, p. 143-204, 1997.
- BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O., Rutina – Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.
- BEVEVINO, L.H.; SANIOTO, S.M.L., Effect of crude extract of roots of *Bredemeyera floribunda* Willd. III. Effect on hormone-stimulated water transport in isolated frog skin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, p. 209-215, 1994
- CALIXTO, J.B., Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guiderlines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CALIXTO, J.B., Twenty five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, S.A.; HADDAD, V.J., **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003, 468 p.
- COSTA, T. R., **Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico**. 2010. 80 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP). Ribeirão Preto. SP, 2010.

CORRÊA, R. S., **Xantonas oxigenadas bioativas: cristalização, estrutura e suas interações intra e intermoleculares**. 2009. 182 f. Dissertação. Física Aplicada. Universidade de São Paulo São Paulo, 2009.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R.; SILVA, A. P.; TEXEIRA, F., **Plantas na terapêutica – Farmacologia e ensaios clínicos**. 1ª ed. Editora: Calouste Gulbenkian, 2008, 476 p.

DAROS, M. R.; MATOS, F. J. A.; PARENTE, F. J. P., A new triterpenoid saponin, bredemeyeroside B, from the roots of *Bredemeyera floribunda*. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 523-527, 1996.

FURNESS, S.H.; STAFFORD, P.J., The Northwest European Pollen Flora, 55 Polygalaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 88, p. 61-82, 1995.

ESMERALDINO, L.E.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v.12, n.8, p. 570-576, 2005.

GÜÇLÜ-ÜNTÜNDAG, O.; BALSEVICH, J.; MAZZA, G., Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 619-630, 2007.

HILL, A.F., **Botánica Económica: Plantas Útiles y productos vegetales**, Barcelona: Ediciones Quega, S.A, 1965, 616p.

JORDAN, S.A; CUNNINGHAM, D.G.; MARLES, R.J., Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 198-216, 2010.

JUNG, J.; MOON, S.; MIN, D.; PARK, W. K.; JUNG, M.; OH, S., Synthesis and evaluation of a series of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid derivatives as potential antinarcotic agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 3, p. 389-398, 2013 .

JÜRGENS, P., **Unidade da UFRJ pesquisa substitutos para soros antiofídicos**. Publicado em 13/10/2005. Disponível em: http://www.faperj.br/boletim_interna.phtml?obj_id=2455. Acesso em: 27/09/2014.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J., The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLOS/ Medicine**. v.5,p. 1549-1676, 2008.

KÜÇÜK, M. S.; KOLAYLI, S.; KARAOGLU, E.; ULUSOY, C.; BALTACI, F.; CANDAN, F., Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from *Anatolia*. **Food Chemistry**, v. 100, p. 526–534, 2007.

LACAILLE-DUBOIS, M.; MITAINE-OFFER, A., Triterpene saponins from Polygalaceae. **Phytochemistry Reviews**. v. 4, p. 139-149, 2005.

LODEIRO, S.; XIONG, Q.; WILSON, W.K.; KOLESNIKOVA, M.D.; ONAK, C.S., MATSUDA, S.P.T., An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse

mechanisms: a challenge to prevailing concepts of triterpene biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 11213–11222, 2007.

LUCAS, E. P. R., **Estudo Inerlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópicos e do soro antibotrópico de referência nacional**. 2009. 91 f. Dissertação. Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2009.

LUDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T.; MIOTTO, S. T. S., *Bredemeyera* Willd. e *Securidata* L. (Polygalaceae) na Região Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 69-79, 2008

MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L., Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 95-146, 2007.

MATOS, F. J. A., **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2007. v. 1. 394 p.

MEBS, D., **Venomous and Poisonous Animals**: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, Germany, 2002, 339 p.

MILGATE, J.; ROBERTS, D.C.K., The nutritional & biological significance of saponinas. **Nutrition Research**, v. 15, n. 8, p. 1223-1249, 1995.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A., Plant natural products active against snake bite: The molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.

MOURA, A. C. S.; VILEGAS, Wagner; SANTOS, L. C., Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsute* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da Atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

NAKAGAWA, M.; NAKANISHI, K.; DARKO, L. L.; VICK, J. A. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Letters**, v.23, p. 3855-3858, 1982.

OLIVEIRA, M. C. F.; SILVEIRA, E. R., Penta-oxygenated xanthenes and fatty acids from *Bredemeyera brevifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 847-851, 2000.

OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, H.W.P.; NUNES, A.S; SILVA, G.H.; CAVALHEIRO, A.J.; CAMPOS, V.P., Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba (SP) Brasil, v.31, n. 3, p. 202-209, 2007.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S.L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R.G.; GARCÍA, M.E.; DÍAZ, A., Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part II: neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 505-511, 2000 a.

OTERO, R.; FONNEGRA R.; JIMÉNEZ, S.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S.; GARCÍA, M.; SILDARRIAGA, M.; DELL VALLE, G.; OSORIO, R.; DÍAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE, A.; VÉLEZ, H., **Mordeduras de serpientes y Etnobotánica**

em el Noroccidente Colombiano. Uso tradicional de las plantas. In: OTERO, R.; FONNEGRA R.; JIMÉNEZ, S., Plantas utilizadas contra mordeduras de serpientes em Antioquia y Choco, 1ªed., Colômbia: Grandacolor Medellín, capítulo II, 2000 b, p. 31-57

PEREIRA, B. M. R.; DAROS, M. R.; PARENTE, J. P.; MATOS, F. J. A., Bredemeyeroside D, a novel triterpenoid saponin from *Bredemeyera floribunda*: A potent snake venom antidote activity on mice. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 666-669, 1996.

PERES, V.; NAGEM, T.J., Naturally occurring penta-oxygenated, hexa-oxygenated and dimeric xanthenes: a literature survey. **Química Nova**, v. 20, n. 4, p. 388-397, 1997

PERSSON, C. Phylogenetic relationships in Polygalaceae based on plastidial DNA Sequences from the *trnL-F* region. **Taxon**, v.50, p. 763-779, 2001.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.L.G.; WETMORE, M.O. M.; LEYVA, A., Antiproliferative Effects of Compounds Derived from Plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 187-191, 2000.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J., Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, p. 1-37, 2013.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D., Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.47, p. 24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; BONFIM, V.L.; NOVELLO, J.C.; NAVARRO OVIEDO, R.; YARLEQUÉ C. A.; MARANGONI, S., Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. **The Protein Journal**, v. 26, n.6, p.387-394, 2007.

RAO, V. R.; MUTHENNA, P.; SHANKARAIAH, G.; AKILESHWARI, C.; BABU, K. H.; SURESH, G.; BABU, K. S.; KUMAR, R. S. C.; PRASAD, K. R.; YADAV, P. A.; PETRASH, J. Mark; REDDY, G. B.; RAO, J. M., Synthesis and biological evaluation of new pipartine analogues as potent aldose reductase inhibitors (ARIs). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 344-361, 2012.

RUSSELL, F. E., **American Indians, snakes and snakebite**. In Russell, F. E (Editor). Snake Venom Poisoning Scholium International, INC., New York, USA, 1983, p. 489-513.

SALAZAR, K. J. M., **Estudo Químico e Biossintético de Peperomias**. Tese de Doutorado. IQ/USP, São Paulo-SP, 2009.

SILVA, G. L.; MATOS, F. J. A.; SILVEIRA, E. R., 4'-Dehydroxycabenegrin A-I from roots of *Harpalyce brasiliana*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 1059-1062, 1997.

SILVEIRA E. R.; FALCÃO M. J. C.; MENEZES JR. A.; DAVID G.I.; THOMAS E. G., Penta-oxygenated xanthenes from *Bredemeyera floribunda*, **Phytochemistry**, v. 39, n. 6, 1995.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S., Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p. 2625-2641, 2005.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; FERNANDES, R.S.; MENALDO, D.L.; COSTA, T.R.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; PEREIRA, P.S., Medinal Plant Extracts and Molecules as the Source of New Anti-Snake Venom Drugs. **Frontiers in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 309-346, 2009.

SOSA, S.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R.G.; PIZZ, C.; ALTINIER, G.; TUBARO A., Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 211-215, 2002.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; STADEN, J.van, Biological activities and distribution of plant saponinas. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219-243, 2004.

UGAZ, O. L., **Investigación Fitoquímica**. 2ª Ed., Peru, p. 296-297, 1994.

VIEIRA, L.M.M.; KIJOA, A., Naturally-occurring xanthonones: recent developments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 2413-2446, 2005.

VILAR, J.C; CARVALHO, C.M; FURTADO, M.F.D., **Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas**. Biologia Geral e Experimental. Universidade Federal de Sergipe. São Cristovão. V.6, n.1, p. 3-36, 2005.

VOEKS, R. A., **Disturbance Pharmacopoeias Medicine and Myth from the Humid Tropics**. Annals of the Association of American Geographers. V.94. p. 868-888, Malden: Oxford, 2004.

Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, S.P.T., On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, p. 261-291, 2004.

YANG, C.; MA, L; WEI, Z.; HAN, F.; GAO, J., Advances in Isolation and Synthesis of Xanthone Derivatives. **Chinese Herbal Medicines**, v. 4, n. 2, p. 87-102, 2012.

ZHENG, X.; YANG, Y.; WANLI; XINZHAO; HUASUN; YUE-HUAWANG, X., Twoxanthonones from *Swertia punicea* with hepatoprotective activities in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 854-863, 2014.